

Aus der Klinik für Neurologie

Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. Lars Timmermann

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

**Trifluoperazin schützt humane dopaminerge Zellen durch Aktivierung der
Autophagie vor Wildtyp-Alpha-Synuklein-induzierter Toxizität**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der
gesamten Humanmedizin

dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Joachim Goebel
aus Bonn

Marburg, 2018

Originaldokument gespeichert auf dem Publikationsserver der
Philipps-Universität Marburg
<http://archiv.ub.uni-marburg.de>



Dieses Werk bzw. Inhalt steht unter einer
Creative Commons
Namensnennung
Keine kommerzielle Nutzung
Weitergabe unter gleichen Bedingungen
3.0 Deutschland Lizenz.

Die vollständige Lizenz finden Sie unter:
<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/de/>

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am: 04.06.2018

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. med. Helmut Schäfer

Referent: Prof. Dr. med. Günter U. Höglinger

Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. Dominik Oliver

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG.....	1
1.1	Parkinson-Syndrom	1
1.1.1	Erstbeschreibung	1
1.1.2	Begriffsdefinition Parkinson-Syndrom.....	1
1.1.3	Epidemiologie	2
1.1.4	Symptomatik.....	2
1.1.5	Neuropathologie.....	4
1.1.6	Ätiologie.....	7
1.1.7	Pathogenese	10
1.1.8	Diagnostik	11
1.1.9	Therapie.....	12
1.2	Alpha-Synuklein	15
1.2.1	Entdeckung/Namensgebung	15
1.2.2	Struktur.....	15
1.2.3	Funktion von Alpha-Synuklein	17
1.2.4	Bedeutung von Alpha-Synuklein für die Parkinson-Krankheit.....	18
1.2.5	Aggregation und Pathogenität von Alpha-Synuklein.....	19
1.3	Autophagie.....	22
1.3.1	Grundlagen der Autophagie	22
1.3.2	Verbindungen zwischen Autophagie und der Parkinson-Krankheit sowie genetischen Formen eines Parkinson-Syndroms	24
1.3.3	Autophagie und Alpha-Synuklein	25
1.4	Ziel der Arbeit	27
2	MATERIAL UND METHODEN.....	28
2.1	Zellkulturmodell der Parkinson-Krankheit.....	28
2.1.1	Zelllinie.....	28
2.1.2	Vorbehandlung der Zellkulturflaschen und der 48-Well-Platten (Coating).....	29
2.1.3	Kultivierung der Zellen.....	29
2.1.4	Aussähen der Zellen für Experimente	31
2.1.5	Wechsel auf Differenzierungsmedium	32

2.1.6	Transduktion mittels adenoviraler Vektoren zur Überexpression von Alpha-Synuklein.....	33
2.2	Material und Methoden zur Beeinflussung der Toxizität im Zellkulturmodell	34
2.2.1	Trifluoperazin.....	34
2.2.2	Behandlung der Zellen	35
2.3	Material und Methoden zur Auswertung der Experimente	35
2.3.1	Auswertung der Zytotoxizität	35
2.3.2	Western Blot.....	39
2.3.3	Messung der Autophagie.....	45
2.3.4	Statistische Auswertung	47
3	ERGEBNISSE.....	48
3.1	Aktivierung der Autophagie durch Trifluoperazin in LUHMES-Neuronen.....	48
3.2	Protektion vor Alpha-Synuklein-Wildtyp-induzierter Toxizität durch Trifluoperazin	50
3.3	Trifluoperazin reduzierte spezifisch eine 37-kDa-Alpha-Synuklein-Western-Blot-Bande	53
3.4	Chloroquin erhöhte die Wildtyp-Alpha-Synuklein-induzierte Toxizität in LUHMES-Neuronen.....	55
3.5	Chloroquin verstärkte die 37-kDa-Alpha-Synuklein-Western-Blot-Bande.....	56
3.6	Hemmung der Degradation von Autophagosomen/Lysosomen durch Alpha-Synuklein-Wildtyp-Überexpression	58
3.7	Zusammenhang zwischen der 37-kDa-Alpha-Synuklein-Western-Blot-Bande und Toxizität	59
4	DISKUSSION	61
4.1	Erkenntnisse hinsichtlich der Beziehung zwischen Alpha-Synuklein und Autophagie	62
4.2	Zusammenhang zwischen der 37-kDa-Alpha-Synuklein-Bande und der Toxizität	68
4.3	Limitationen des verwendeten Zellkulturmodells	70
4.4	Schlussfolgerung und Ausblick	71
5	ZUSAMMENFASSUNG	73
5.1	Deutsche Zusammenfassung	73

5.2	Englische Zusammenfassung	74
6	LITERATURVERZEICHNIS	77
7	ANHANG	97
7.1	Verzeichnis der akademischen Lehrer	97
7.2	Danksagung.....	97

1 Einleitung

1.1 Parkinson-Syndrom

1.1.1 Erstbeschreibung

1817 beschrieb James Parkinson in seinem Artikel „An essay of the shaking palsy“ eine neurologische Erkrankung. Diese Erkrankung ist heutzutage bekannt als Parkinson-Krankheit oder idiopathisches Parkinson-Syndrom (Parkinson, 1817; Samii et al., 2004). Die Parkinson-Krankheit gehört zu der großen Gruppe der Parkinson-Syndrome.

1.1.2 Begriffsdefinition Parkinson-Syndrom

Das Parkinson-Syndrom ist ein syndromaler Überbegriff, für den die Parkinson-Krankheit die häufigste Ursache darstellt (Deutsche Gesellschaft für Neurologie, 2016). Das Parkinson-Syndrom ist charakterisiert durch das klinische Bild einer Bradykinese in Kombination mit mindestens einem der drei folgenden Symptome: Rigor, Ruhetremor und posturale Instabilität (Hughes et al., 1992).

Die Deutsche Gesellschaft für Neurologie teilt die Parkinson-Syndrome unter ätiologischen Gesichtspunkten in vier Gruppen ein (Deutsche Gesellschaft für Neurologie, 2016):

1. Parkinson-Krankheit/idiopathisches Parkinson-Syndrom
2. Genetische Parkinson-Syndrome
3. Parkinson-Syndrom im Rahmen anderer neurodegenerativer Erkrankungen (atypische Parkinson-Syndrome), z.B. Multisystematrophie (MSA), Demenz vom Lewy-Körperchen-Typ (DLB), progressive supranukleäre Blickparese (PSP), kortikobasale Degeneration (CBD)
4. Symptomatische (sekundäre) Parkinson-Syndrome, z.B. medikamenten-induziert, posttraumatisch, toxin-induziert (z. B. durch Kohlenmonoxid, Mangan), metabolisch (z. B. Morbus Wilson, Hypoparathyreoidismus), entzündlich (AIDS-Enzephalopathie oder seltene Enzephalitiden)

Weiterhin können die neurodegenerativen Parkinson-Syndrome aus den Gruppen 1 und 3 aus neuropathologischer Sicht in Synukleinopathien (Parkinson-Krankheit, DLB, MSA) und Tauopathien (PSP, CBD) eingeteilt werden (Deutsche Gesellschaft für Neurologie, 2016).

Aufgrund der Relevanz für die vorliegende Arbeit wird im Weiteren hauptsächlich auf die Parkinson-Krankheit und – mit Abstrichen – auf genetische Formen des Parkinson-Syndroms eingegangen.

1.1.3 Epidemiologie

Die Parkinson-Krankheit ist die zweithäufigste neurodegenerative Erkrankung nach der Alzheimer-Demenz, und betrifft etwa 0,3 % der Gesamtbevölkerung in industrialisierten Staaten (de Lau and Breteler, 2006; Samii et al., 2004). Die Prävalenz der Parkinson-Krankheit steigt stark mit zunehmendem Alter an und liegt in Europa bei etwa 1,8 % für alle Personen über 65 Jahre (de Rijk et al., 2000; Hindle, 2010). Die Parkinson-Krankheit ist für etwa 75 % aller Parkinson-Syndrome verantwortlich (Deutsche Gesellschaft für Neurologie, 2016), wobei die Angaben hinsichtlich des prozentualen Anteils der Parkinson-Krankheit an allen Parkinson-Syndromen zwischen einzelnen Studien stark variieren (de Rijk et al., 1997). Ob das männliche Geschlecht einen eigenständigen Risikofaktor darstellt, wird kontrovers diskutiert; in einem Übersichtsartikel wurde in fünf von neun Studien eine signifikant höhere Prävalenz in der männlichen Bevölkerung beschrieben, wohingegen die restlichen vier Studien keine signifikanten Unterschiede zwischen den Geschlechtern errechneten (Twelves et al., 2003). Das mediane Erkrankungsalter für die Parkinson-Krankheit liegt bei circa 68 Jahren (Inzelberg et al., 2002) und die mittlere Überlebenszeit nach Diagnosestellung beträgt 15 Jahre (Inzelberg et al., 2002; Lees et al., 2009). Die standardisierte Mortalitätsrate im Vergleich zur Gesamtbevölkerung wird auf knapp 1,9 geschätzt, wobei die Pneumonie mit circa 45 % die häufigste Todesursache von Parkinson-Patienten darstellt (Katzenschlager et al., 2008; Pennington et al., 2010).

1.1.4 Symptomatik

Die Symptome der Parkinson-Krankheit können eingeteilt werden in motorische Störungen und nicht-motorische Störungen. Die Kardinalsymptome der Parkinson-Krankheit sind die motorischen Beeinträchtigungen Bradykinese, Ruhetremor, Rigidity sowie die posturale Instabilität (Lees et al., 2009; Abbildung 1). Das fundamentale Leitsymptom ist die Bradykinese, also die Verlangsamung bei der Initiierung und Durchführung willkürlicher Bewegungen, sowie die Abnahme der Amplitude bei repetitiven Bewegungen (Deutsche Gesellschaft für Neurologie, 2012). Ein Ruhetremor mit einer Frequenz von 4-6 Herz stellt in 70 % der Fälle das Erstsymptom dar, wohingegen die posturale Instabilität meist erst im späteren

Krankheitsverlauf einsetzt (Samii et al., 2004). Zu Beginn der Erkrankung sind die motorischen Symptome subtil und werden häufig für längere Zeit als gewöhnliche Alterserscheinungen missinterpretiert oder gar nicht bemerkt (Lees et al., 2009).

Zu den möglichen nicht-motorischen Störungen der Parkinson-Krankheit gehören kognitive Störungen (u.a. frontale Störungen, dementielle Entwicklung), sensorische Störungen (u.a. Hyposmie, Schmerzen), Schlafstörungen (insbesondere REM-Schlaf-Verhaltensstörungen (RBD, für Englisch: REM-sleep behaviour disorder), aber auch Tagesschläfrigkeit, Schlafattacken und Störungen des Nachtschlafes durch ein begleitendes Restless-Legs-Syndrom), autonome Störungen (u.a. Dranginkontinenz, Obstipation, erektile Dysfunktion, orthostatische Hypotonie) und psychiatrische Störungen (u.a. Halluzinationen, Depressionen) (Deutsche Gesellschaft für Neurologie, 2012; Lees et al., 2009; Samii et al., 2004).

Dabei ist die Hyposmie eines der frühesten Symptome der Parkinson-Krankheit, wobei hiervon selten spontan berichtet wird und oft erst durch formelle Testung des Geruchssinns der Patienten auffällt (Doty et al., 1995). Vokalisieren und einfache Extremitätenbewegungen bis hin zu komplexen motorischen Verhaltensweisen während des Träumens (wie Schlagen und Aus-dem-Bett-Springen) deuten auf eine RBD hin (Boeve, 2010; Oertel et al., 2014). In einer longitudinalen Studie entwickelten 81 % von 26 RBD-Patienten eine neurodegenerative Erkrankung und alleine 13, also 50 %, dieser Patienten eine Parkinson-Krankheit (Schenck et al., 2013). Dabei kann die RBD den motorischen Symptomen der Parkinson-Krankheit um Jahre bis Jahrzehnte vorausgehen (Claassen et al., 2010). Bei den kognitiven Störungen dominieren insbesondere

visuokonstruktive Schwierigkeiten, Störungen der Aufmerksamkeit und Vigilanz sowie Störungen der Exekutivfunktionen; diese Störungen sind sogar häufiger als bei der Alzheimer-Erkrankung (Lees et al., 2009). Insgesamt kommt es in etwa 40 % aller Fälle zur Entwicklung



Abbildung 1 (aus Lees et al., 2009): Illustration des leicht ängstlichen, hypokinetischen Gesichtsausdrucks und der typischen gebeugten Körperhaltung eines Patienten der Parkinson-Krankheit

einer Demenz (Emre, 2003), wobei eine Studie in der Endphase der Erkrankung sogar bei 80 % aller untersuchten Patienten eine Demenz feststellte (Cedarbaum and McDowell, 1987).

Die Kombination aus dopaminerger Therapie und dementieller Entwicklung führt bei vielen Patienten zu Halluzinationen und psychotischem Verhalten (Samii et al., 2004). Eine Depression lässt sich bei fast der Hälfte aller Parkinson-Krankheit-Patienten nachweisen (McDonald et al., 2003).

In der Endphase der Parkinson-Krankheit ist das Gesicht der Patienten maskenhaft und ausdruckslos, die Sprache monoton und undeutlich, die Haltung vornübergebeugt und die Hände zeigen oft einen ausgeprägten Tremor (Lees et al., 2009). Häufig kommt es auch zu einem sogenannten „freezing of gait“, das heißt die Patienten erstarren unvorhergesehen und benötigen mehrere Sekunden zur Initiierung der Bewegung (Lees et al., 2009). Aufgrund der Bewegungsverlangsamung und der Störungen der Feinmotorik benötigen die meisten Patienten in der Endphase der Erkrankung pflegerische Hilfe (Lees et al., 2009).

Da bei der vorliegenden Arbeit mit einem Parkinson-Krankheit-Zellkulturmodell gearbeitet wurde, welches auf Alpha-Synuklein-induzierter Toxizität beruht, soll im Folgenden noch auf die Symptomatik von Patienten mit genetischen Veränderungen des Alpha-Synuklein-Gens (*SNCA*) eingegangen werden: Veränderungen von *SNCA* können zu genetischen Formen eines Parkinson-Syndroms führen (Gasser, 2009). Abhängig von der genauen Punktmutation zeigen manche Individuen mit krankheitsauslösenden Punktmutationen Phänotypen, die ununterscheidbar von der Parkinson-Krankheit sind, andere Patienten mit Punktmutationen haben dagegen einen früheren Krankheitsbeginn und/oder eine höhere Prävalenz an Demenz (Gasser, 2009). Genmultiplikationen von *SNCA* können ebenso zu genetischen Formen eines Parkinson-Syndroms führen. Dabei zeigen Patienten mit Duplikationen einen Phänotyp, der der Parkinson-Krankheit stark ähnelt (Chartier-Harlin et al., 2004); wohingegen Triplikationen eher zu einem früh beginnenden Parkinson-Syndrom führen und die dementielle Entwicklung stärker als bei der Parkinson-Krankheit im Vordergrund steht (Farrer et al., 2004; Singleton et al., 2003).

1.1.5 Neuropathologie

Die Parkinson-Krankheit ist insbesondere durch zwei neuropathologische Auffälligkeiten gekennzeichnet: Zum einen durch einen Regionen-spezifischer Verlust an dopaminergen, Neuromelanin-enthaltenden Neuronen der *Substantia nigra pars compacta* (Fearnley and Lees, 1991; Foix and Nicolesco, 1925) und zum anderen durch die Präsenz von intraneuronalen

Einschlüssen, sogenannten Lewy-Körperchen, in überlebenden Neuronen der *Substantia nigra pars compacta* (Gibb and Lees, 1988; Lewy, 1913; Abbildung 2). Mit den Lewy-Körperchen vergleichbare neuronale Einschlüsse innerhalb der Neuronen-Fortsätze werden als Lewy-Neuriten bezeichnet und die Kombination von Lewy-Körperchen und Lewy-Neuriten manchmal als Lewy-assoziierte Pathologie (Dickson, 2012; Dickson et al., 2009). Anhand der Morphologie werden Lewy-Körperchen in die klassischen, im Hirnstamm lokalisierten, und die kortikalen Lewy-Körperchen eingeteilt (Dickson, 2012; Lees et al., 2009). Die klassischen, im Hirnstamm lokalisierten Lewy-

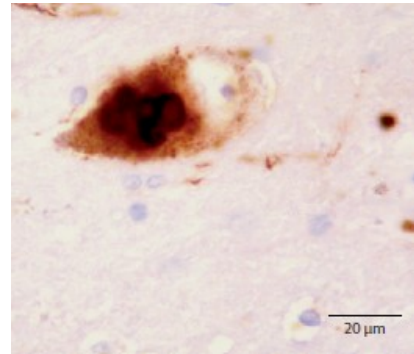


Abbildung 2 (aus Lees et al., 2009): Überlebendes Neuron in der *Substantia nigra* eines Patienten der Parkinson-Krankheit mit mehreren Lewy-Körperchen

Körperchen sind rundlich und haben einen Durchmesser von 8-30 μm mit hyalinem Zentrum und einer blassen Umrandung. Kortikal gelegene Lewy-Körperchen haben dagegen eine irregulärere Form und meist fehlt eine klare Abgrenzung zwischen innerem Zentrum und blasser Umrandung (Lees et al., 2009; Wakabayashi et al., 2007). Ultrastrukturell bestehen beide Formen aus filamentösen Strukturen (Duffy and Tennyson, 1965; Kosaka, 1978). Die Hauptkomponente der Lewy-Körperchen ist eine abnorme, posttranslational-modifizierte und aggregierte Form des Proteins Alpha-Synuklein (Fujiwara et al., 2002; Spillantini et al., 1997). Alpha-Synuklein-Antikörper färben Lewy-Körperchen und Lewy-Neuriten und stellen aktuell die sensitivste immunhistochemische Nachweismethode in der Routinediagnostik dar (Wakabayashi et al., 2007).

Die oben beschriebenen motorischen Kardinalsymptome der Parkinson-Krankheit sind hauptsächlich auf den Verlust der dopaminergen Neurone der *Substantia nigra pars compacta* zurückzuführen, welche zum Striatum projizieren (dopaminerges nigrostriatales System) (Blandini et al., 2000; Ehringer and Hornykiewicz, 1960). Patienten zeigen aber erst die charakteristischen motorischen Störungen, wenn etwa 50 % aller nigralen Neurone degeneriert sind und sich das striatale Dopamin um etwa 80 % reduziert hat. Dies impliziert – zusätzlich zum neuronalen Verlust – eine Funktionsstörung der überlebenden nigralen Neuronen bei Parkinson-Krankheit-Patienten (Bernheimer et al., 1973; Fearnley and Lees, 1991).

Neben dem Verlust der dopaminergen Neuronen der *Substantia nigra pars compacta* kommt es aber auch zum Zellverlust im *Locus caeruleus*, im dorsalen Kern des *Nervus vagus*, in den Raphe-Kernen, im *Nucleus basalis Meynert* und einigen anderen katecholaminergen

Hirnstamm-Strukturen einschließlich der ventrotergmentalen Region (Damier et al., 1999; Lees et al., 2009).

Ebenso ist auch die Lewy-Körperchen-Pathologie nicht auf die nigrostriatalen Projektionen begrenzt, denn Lewy-Körperchen finden sich unter anderem auch im *Locus caeruleus*, im dorsalen Kern des *Nervus vagus*, im *Nucleus basalis Meynert*, im *Bulbus olfactorius*, im Hypothalamus, im cerebralen Kortex, in autonomen Ganglia und im Thalamus (Bethlem and Den Hartog Jager, 1960; Braak et al., 2003; Gibb and Lees, 1988). Es handelt sich bei der Parkinson-Krankheit also um eine multisystemische Krankheit, die viele Bereiche des zentralen Nervensystems in die Degeneration einschließt. Die nicht-motorischen Symptome der Parkinson-Krankheit werden insbesondere auf den Zellverlust und die pathologischen Veränderungen dieser nicht-nigrostriatalen Systeme zurückgeführt (Braak and Del Tredici, 2009; Dickson et al., 2009).

Braak und seine Kollegen postulierten einen stadienhaften Verlauf der Ausbreitung der Lewy-Körperchen-Pathologie bei der Parkinson-Krankheit. Dieser Verlauf kann nach Braak in sechs unterschiedliche Stadien eingeteilt werden und folgt einem konstanten Ausbreitungsmuster entlang von Axonen (Braak et al., 2003, 2004, 2006). In diesem Modell stellen der gastrale, autonome Meissner-Plexus, das Rückenmark und die olfaktorischen Nervenenden die Ausgangspunkte der pathologischen Entwicklung dar, von denen aus sich die Pathologie in den Stadien eins und zwei im dorsalen Kern des *Nervus vagus*, in den kaudalen Raphe-Kernen und im *Locus caeruleus* ausbreitet. In den Stadien drei und vier ascendiert die Pathologie vom kaudalen Hirnstamm, sodass die *Substantia nigra pars compacta*, die *Amygdala* und thalamische Kerne betroffen sind. Auf kortikaler Ebene ist zunächst der temporale Mesokortex affektiert, bevor in den Stadien fünf und sechs auch der frontale, parietale und temporale Neokortex in die Lewy-Körperchen-Pathologie involviert werden. Zumindest in Teilen und bei einem gewissen Prozentsatz der Parkinson-Krankheit-Patienten konnte dieses Stadiensystem durch andere Forscher bestätigt werden (Beach et al., 2009; Bloch et al., 2006; Zaccai et al., 2008); allerdings zeigen mindestens 15 % aller Parkinson-Patienten andere pathologische Muster, sodass das von Braak und Kollegen vorgeschlagene Stadiensystem nicht unumstritten ist (Kalaitzakis et al., 2008; Parkkinen et al., 2008).

In jedem Fall muss bei dieser Stadieneinteilung beachtet werden, dass sie auf der Verteilung abnormaler Alpha-Synuklein-Ablagerungen beruht und nicht auf der Verteilung des neuronalen Zellverlustes (Dickson, 2012). Auch wenn Lewy-Körperchen und der neuronale Zelltod die neuropathologischen Kennzeichen der Parkinson-Krankheit darstellen, ist der Zusammenhang zwischen diesen beiden Phänomenen weniger klar: Es konnte gezeigt werden,

dass Neurone in der *Substantia nigra pars compacta*, die Lewy-Körperchen enthalten, im Vergleich zu Neuronen ohne Lewy-Körperchen, nicht stärker für den apoptotischen Zelltod prädisponiert sind und, dass die Mehrheit absterbender Neurone keine Lewy-Körperchen enthält (Tompkins and Hill, 1997). Auch gelang es in den meisten Studien nicht, eine Korrelation zwischen der Lewy-Körperchen-Dichte und den klinischen Symptomen herzustellen (Schulz-Schaeffer, 2010).

Interessanterweise lassen sich auch bei etwa 10-15 % bis zum Ableben neurologisch gesunder Erwachsener über 60 Jahre Lewy-Körperchen im Gehirn nachweisen (Gibb and Lees, 1988). Im Englischen wird dafür der Begriff „incidental Lewy body disease“ verwendet (Gibb and Lees, 1988; Hindle, 2010). Es gibt Hinweise darauf, dass es sich dabei um eine präsymptomatische Phase der Parkinson-Krankheit handelt (DelleDonne et al., 2008; Dickson et al., 2008). Falls dies zuträfe, gäbe es zehnmal mehr Menschen, die Gefahr laufen eine Parkinson-Krankheit zu entwickeln, als Personen, die jemals daran erkranken.

Wie stellen sich genetische Formen des Parkinson-Syndroms, die auf Veränderungen von *SNCA* beruhen, in neuropathologischer Hinsicht dar? Bisher gibt es Berichte über 19 Autopsien von Trägern von *SNCA*-Mutationen und *SNCA*-Multiplikationen (Poulopoulos et al., 2012). Alle 19 Autopsien zeigten Neurone, die Alpha-Synuklein in Form von Lewy-Körperchen und Lewy-Neuriten enthielten und neuronalen Zellverlust, der am stärksten in der *Substantia nigra pars compacta* und im *Locus caeruleus* ausgeprägt war. Insgesamt bestehen also große Ähnlichkeiten mit der Parkinson-Krankheit-Neuropathologie (Poulopoulos et al., 2012). Im Vergleich zu Patienten mit einer Parkinson-Krankheit war allerdings der kortikale neuronale Zellverlust stärker ausgeprägt, zudem war häufiger als bei Parkinson-Krankheit-Patienten zusätzlich eine Tau-Pathologie nachweisbar (Poulopoulos et al., 2012).

1.1.6 Ätiologie

Bei einem kleinen Anteil der Patienten, die an einem Parkinson-Syndrom leiden, ist die Ursache monokausal. Dazu gehören insbesondere die genetischen Formen eines Parkinson-Syndroms, medikamenten-induzierte Parkinson-Syndrome und auch die geringe Anzahl an Fällen eines Parkinson-Syndroms nach 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin (MPTP)-Exposition (Ballard et al., 1985; Gasser, 2009; Langston et al., 1983, 1999). Die genaue Ätiologie der Parkinson-Krankheit und damit die Ursache des neuronalen Zellverlustes und der Entstehung von Lewy-Körperchen sowie Lewy-Neuriten ist dagegen weiterhin unbekannt (Kiebertz and Wunderle, 2013). Man geht davon aus, dass eine komplexe Mischung aus Altern,

genetischer Suszeptibilität, der Exposition gegenüber Umweltfaktoren und des Lebensstils in unterschiedlichem Ausmaß für die Entstehung der Parkinson-Krankheit verantwortlich ist (Steece-Collier et al., 2002; Venda et al., 2010).

1.1.6.1 Rolle des Alterns

Das Altern ist aktuell der stärkste bekannte individuelle Risikofaktor der Parkinson-Krankheit (Hindle, 2010; Lees et al., 2009): In allen Populationen steigt das Risiko an der Parkinson-Krankheit zu erkranken mit zunehmendem Alter an (Bower et al., 2000; de Rijk et al., 2000; Hindle, 2010). Allerdings sind immerhin circa 10 % der Patienten bei Diagnosestellung jünger als 45 Jahre (Lees et al., 2009). Schon bei neurologisch gesunden Personen kommt es mit dem Alter zu einem Verlust dopaminerger Neurone in der *Substantia nigra pars compacta* und zusätzlich zu einer Funktionseinschränkung der überlebenden Zellen (McGeer et al., 1977). Protektive Mechanismen gegen neuronalen Zelltod umfassen eine funktionierende mitochondriale Zellatmung, ein funktionierendes Ubiquitin-Proteasom-System und die Aktivität der Autophagie (Hindle, 2010). Das Altern ist dagegen unter anderem assoziiert mit mitochondrialer Dysfunktion, genomischer Instabilität, vermehrter Radikalbildung und einem zunehmenden Aktivitätsverlust des Proteasoms sowie der Autophagie (Cherra and Chu, 2008; Migliore and Coppedè, 2009; Tai and Schuman, 2008), sodass vermutlich ein Verlust dieser Kompensationsmechanismen mit zunehmendem Alter bei Personen, die aufgrund von genetischen Faktoren und Umweltfaktoren für die Parkinson-Krankheit prädisponiert sind, zur Entstehung der Parkinson-Krankheit beiträgt (Hindle, 2010).

1.1.6.2 Rolle der Umweltfaktoren und des Lebensstils

Dass Umweltfaktoren erheblich zur Entwicklung eines Parkinson-Syndroms beitragen können, wurde insbesondere durch folgende Beobachtung offenbar: Langston und Kollegen beschrieben 7 Patienten, die nach dem Konsum von MPTP ein akutes L-Dopa-responsives Parkinson-Syndrom entwickelten (Ballard et al., 1985; Langston et al., 1983). MPTP kann die Blut-Hirn-Schranke passieren und wird innerhalb des Gehirns durch Astrozyten mittels der Monoaminoxidase-B in 1-Methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺) metabolisiert, welches über den Dopamin-Transporter selektiv von dopaminergen Neuronen aufgenommen wird und durch Hemmung der mitochondrialen Atmungskette neurotoxisch wirkt (Singer and Ramsay, 1990). Der Verlust der dopaminergen Neuronen führt dann zur Entwicklung des Parkinson-Syndroms (Langston et al., 1999). MPTP spielt allerdings keine Rolle in der Entwicklung der Parkinson-

Krankheit. Dennoch hat diese Beobachtung zu der Überlegung geführt, dass Umweltfaktoren auch ein entscheidender Faktor bei der Ätiologie der Parkinson-Krankheit sein könnten (Kiebertz and Wunderle, 2013). Tanner und Kollegen fanden eine signifikant erhöhte Wahrscheinlichkeit für die Entwicklung einer Parkinson-Krankheit bei Personen, die aus beruflichen Gründen verstärkt Pestiziden ausgesetzt waren. Unter den Pestiziden befanden sich Inhibitoren des Komplex-I der mitochondrialen Atmungskette und oxidative Stressoren (Tanner et al., 2011). Weiterhin wurden auch die Exposition und Aufnahme von Schwermetallen häufig mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung einer Parkinson-Krankheit assoziiert (Breydo et al., 2012). Auch Lebensereignisse und der Lebensstil spielen anscheinend eine Rolle bei der Entwicklung einer Parkinson-Krankheit: Eine Untersuchung fand ein erhöhtes Auftreten der Parkinson-Krankheit bei Patienten, die in ihrem Leben ein Schädel-Hirn-Trauma mit Amnesie oder Verlust des Bewusstseins durchlebt hatten (Goldman et al., 2006). Zudem scheint fehlende körperliche Aktivität ein Risikofaktor für die Parkinson-Krankheit zu sein (Thacker et al., 2008). Bei all den genannten Risikofaktoren muss allerdings bedacht werden, dass es sich nur um Assoziationen und nicht nachgewiesenermaßen um kausale Zusammenhänge handelt.

Umgekehrt gibt es auch beschriebene protektive Einflussfaktoren: Dabei sind insbesondere Rauchen, Koffeinkonsum und – mit Abstrichen – die regelmäßige Einnahme von nichtsteroidalen Antirheumatika zu nennen (Kiebertz and Wunderle, 2013). In einem Übersichtsartikel wurde eine Risikoreduktion von circa 40 % für Personen, die jemals Zigaretten rauchten, im Vergleich zu Nichtrauchern beschrieben (Hernán et al., 2002). Eine potentielle Erklärung ist der für Nikotin beobachtete neuroprotektive Effekt (Iwamoto et al., 2013). Ebenso zeigt sich ein inverser Zusammenhang zwischen Koffeinkonsum und dem Auftreten der Parkinson-Krankheit (Hernán et al., 2002; Palacios et al., 2012). Hier wird als mögliche Erklärung die Hemmung des Adenosin-Rezeptors A2A durch Koffein angeführt, der möglicherweise dopaminerge Neurone schützt (Kiebertz and Wunderle, 2013).

1.1.6.3 Rolle der genetischen Faktoren

Bei der ätiologischen Rolle der genetischen Faktoren muss klar zwischen den genetischen Formen eines Parkinson-Syndroms und der Parkinson-Krankheit getrennt werden. 1997 berichteten Polymeropoulos und Kollegen, dass eine sinnverändernde Mutation in *SNCA* zur Entwicklung eines Parkinson-Syndroms führt (Polymeropoulos et al., 1997). Seitdem wurden eine Vielzahl an Genloci und Mutationen entdeckt, die mit einer hohen Penetranz zur

Entwicklung eines genetischen Parkinson-Syndroms führen (Gasser, 2009). Insgesamt konnte bisher für Mutationen in neun Genloci nachgewiesen werden, dass sie zu einer monogenetischen Form eines Parkinson-Syndroms führen (Gasser et al., 2011). Unter anderem sind inzwischen fünf sinnverändernde Mutationen von *SNCA* (A30P, E46K, H50Q, G51D und A53T) bekannt (Appel-Cresswell et al., 2013; Krüger et al., 1998; Lesage et al., 2013; Polymeropoulos et al., 1997; Zarranz et al., 2004). Zudem führen auch Duplikationen und Triplikationen von *SNCA* zu einem genetischen Parkinson-Syndrom (Chartier-Harlin et al., 2004; Singleton et al., 2003).

Aber nicht nur für die genetischen Formen eines Parkinson-Syndroms, sondern auch für die Parkinson-Krankheit sind genetische Einflüsse bekannt: Durch mehrere genomweite Assoziationsstudien (GWAS) wurde eine Vielzahl an Risikogenvarianten für die Parkinson-Krankheit identifiziert (International Parkinson's Disease Genomics Consortium (IPDGC) and Wellcome Trust Case Control Consortium 2 (WTCCC2), 2011; Lill et al., 2012). Für die meisten dieser Genvarianten liegt die Risikorate zwischen 1,1 und 1,35, sodass sie alleine nur zu einer kleinen Risikoerhöhung führen (Lill et al., 2012). Unter diesen identifizierten Genloci findet sich – ebenso wie bei den genetischen Formen des Parkinson-Syndroms – auch wieder *SNCA* mit hoher Signifikanz (Gasser et al., 2011; Lill et al., 2012). Wie groß aber der genetische Einfluss bei der Parkinson-Krankheit ist, bleibt weiterhin unklar: Die Summe aller aktuell bekannten Risikogenvarianten ist nur für etwa 10-20 % des attributablen Risikos der Gesamtbevölkerung verantwortlich (Engeholm and Gasser, 2013). Dennoch glauben viele Forscher, dass die eigentliche genetische Beteiligung an der Ätiologie der Parkinson-Krankheit höher ist. In Hypothesen werden epigenetische Einflüsse, somatische Mutationen und sehr seltene Genvarianten, die allesamt durch GWAS nicht erkannt werden können, für diese mutmaßlich vorhandene Diskrepanz zwischen tatsächlicher genetischer Beteiligung und der bisher identifizierten genetischen Beteiligung verantwortlich gemacht (Engeholm and Gasser, 2013; Manolio et al., 2009).

1.1.7 Pathogenese

Durch welche Mechanismen diese Mischung aus verschiedenen Risikofaktoren zur Entstehung von Lewy-Körperchen, Lewy-Neuriten und schließlich zum neuronalen Zelltod führt – also die Pathogenese der Parkinson-Krankheit – ist nicht bis ins Detail bekannt (Samii et al., 2004). Die bisherigen Hinweise ergeben sich insbesondere aus postmortalen Untersuchungen, den identifizierten Genloci sowie Tiermodellen und Zellkulturmodellen der Parkinson-Krankheit. Als

Schlüsselereignis, welches zur Neurodegeneration führt, wird die ungewollte Aggregation des Alpha-Synuklein-Proteins angesehen (Deleersnijder et al., 2013; Periquet et al., 2007; Shulman et al., 2011). Aufgrund der Bedeutung von Alpha-Synuklein für die vorliegende Arbeit soll dies unter dem Abschnitt „Alpha-Synuklein“ detaillierter ausgeführt werden. Eine Reihe von intrazellulären Veränderungen werden für die neuronalen Funktionsstörungen und den neuronalen Zelltod verantwortlich gemacht: Störungen der mitochondrialen Zellatmung (Schapira et al., 1989, 1990; Shoffner et al., 1991), oxidativer Stress (Dexter et al., 1991; Owen et al., 1996; Schapira, 1995), Exzitotoxizität (Good et al., 1998), Störungen der Autophagie (Alegre-Abarrategui et al., 2009; Bandyopadhyay et al., 2007), Störungen des Ubiquitin-Proteasom-Systems (McNaught et al., 2003), Aktivierung der Mikroglia und Neuroinflammation (Deleidi and Gasser, 2013). Unklar bleibt dabei, ob diese zellulären Veränderungen zur Alpha-Synuklein-Aggregation führen oder ob die Alpha-Synuklein-Aggregation diese intrazellulären Funktionsstörungen bedingt (Shulman et al., 2011). Der präferentielle Verlust dopaminerger Neurone der *Substantia nigra pars compacta* wird auf besondere Eigenschaften dieser Zellen zurückgeführt: Dazu zählen unter anderem außergewöhnlich hohe metabolische Anforderungen, ein spezieller Besatz an Calcium- und Kalium-Kanälen, die Interaktion zwischen Alpha-Synuklein und Dopamin sowie hohe Konzentrationen an Eisen und Dopamin, welche beide für die Entstehung oxidativer Produkte prädestinieren (Sulzer, 2007; Venda et al., 2010).

1.1.8 Diagnostik

Die Diagnose der Parkinson-Krankheit wird klinisch gestellt und stützt sich hauptsächlich auf eine genaue klinisch-neurologische Untersuchung und anamnestische Angaben (Deutsche Gesellschaft für Neurologie, 2016; Samii et al., 2004). Die Deutsche Gesellschaft für Neurologie orientiert sich dabei an den Kriterien der UK Brain Bank und empfiehlt in ihrer Leitlinie ein dreischrittiges Vorgehen (Deutsche Gesellschaft für Neurologie, 2016; Hughes et al., 1992): Der erste Schritt besteht in dem Nachweis eines Parkinson-Syndroms, also dem Vorliegen einer Bradykinese und zusätzlichem Nachweis eines muskulären Rigors, eines Ruhetremors oder einer posturalen Instabilität (Deutsche Gesellschaft für Neurologie, 2016). Im zweiten diagnostischen Schritt erfolgt die Suche nach Hinweisen auf ein atypisches Parkinson-Syndrom, ein symptomatisches Parkinson-Syndrom und sonstige häufige Differentialdiagnosen der Parkinson-Krankheit. Dazu gehören zum Beispiel Fragen nach einer Behandlung mit antidopaminerger Medikation, nach einer diagnostisch gesicherten Enzephalitis in der

Vorgeschichte und nach wiederholten ischämischen Insulten mit stufenweiser Verschlechterung der Parkinson-Symptomatik sowie die Untersuchung auf eine supranukleäre vertikale Blickparese als Hinweis auf eine PSP oder eine frühzeitige und schwere Störung des autonomen Nervensystems als Hinweis auf eine MSA (Deutsche Gesellschaft für Neurologie, 2016). Im abschließenden dritten Schritt wird beurteilt, ob (bereits) prospektive positive Kriterien für die Parkinson-Krankheit vorliegen. Dazu zählen die Kriterien einseitiger Beginn der Erkrankung, Vorliegen eines Ruhetremors, progressive Erkrankung, persistierende Seitenasymmetrie im Verlauf, sehr gutes Ansprechen auf Levodopa, Auftreten von schweren Dopa-induzierten Dyskinesien, Ansprechen auf Levodopa für länger als 5 Jahre und Verlauf der Erkrankung über mehr als 10 Jahre (Deutsche Gesellschaft für Neurologie, 2016). Drei der oben genannten acht Kriterien sind für die Diagnose „definite Parkinson’s disease“ erforderlich (Deutsche Gesellschaft für Neurologie, 2016).

Zur Basisdiagnostik gehören dementsprechend die Anamnese und eine komplette klinisch-neurologische Untersuchung sowie in der Regel einmalig eine cerebrale strukturelle Bildgebung mittels Magnetresonanztomographie (Deutsche Gesellschaft für Neurologie, 2012). Dabei dient die Bildgebung insbesondere dem Ausschluss von Differentialdiagnosen der Parkinson-Krankheit, wie dem Normaldruckhydrozephalus oder einer ausgeprägten Mikroangiopathie.

Als Goldstandard zur Bestätigung der klinischen Diagnose gilt die Autopsie mit neuropathologischer Befundung (Samii et al., 2004). In unterschiedlichen Studien bestätigt sich die klinische Diagnose einer Parkinson-Krankheit in der neuropathologischen Untersuchung in 76-98 % der Fälle (Hughes et al., 1992, 2002). Allerdings ergeben sich sogar bei der neuropathologischen Untersuchung Schwierigkeiten: So kann eine Parkinson-Krankheit mit neuropathologischen Methoden nicht zweifelsfrei nachgewiesen werden, sondern es ist nur die Beschreibung von pathologischen Auffälligkeiten möglich, die mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit mit einer Parkinson-Krankheit assoziiert sind (Dickson et al., 2009). Schwierigkeiten ergeben sich unter anderem durch die „incidental Lewy body disease“ und die bisher fehlenden eindeutigen neuropathologischen Unterschiede zwischen der Parkinson-Krankheit und der DLB (Dickson et al., 2009).

1.1.9 Therapie

Die Parkinson-Krankheit ist zum jetzigen Zeitpunkt eine unheilbare, progrediente Erkrankung (Worth, 2013). Zudem gibt es aktuell auch keine Therapie, die nachgewiesenermaßen die

Krankheitsprogression verzögert oder gar aufhält (Worth, 2013). Ziel der Therapie ist also die Linderung der Symptome und eine Verbesserung der Lebensqualität; dabei ist das genaue therapeutische Ziel insbesondere abhängig vom Lebensalter, Krankheitsstadium und sozialer Situation (Deutsche Gesellschaft für Neurologie, 2012). Zur medikamentösen Therapie der motorischen Symptome der Parkinson-Krankheit stehen zahlreiche Optionen zur Verfügung: L-Dopa in Kombination mit einem Dopa-Decarboxylase-Inhibitor, Dopamin-Agonisten, Catechol-O-Methyltransferase-Hemmer, Monoaminoxidase-B-Hemmer, NMDA-Antagonisten und Anticholinergika (Deutsche Gesellschaft für Neurologie, 2012; Worth, 2013). Bis auf die NMDA-Antagonisten und die Anticholinergika besteht der Wirkmechanismus dabei in einer verstärkten dopaminergen Wirkung entweder durch Erhöhung von Dopamin im synaptischen Spalt oder – im Falle der Dopamin-Agonisten – durch direkte Wirkung am Dopamin-D₂-Rezeptor. Die effektivste Therapie besteht in der L-Dopa-Gabe in fixer Kombination mit einem Dopa-Decarboxylase-Inhibitor (Deutsche Gesellschaft für Neurologie, 2012; Fahn et al., 2004; Holloway et al., 2004; Oertel et al., 2006). Seit 2015 ist zudem in Europa mit Safinamid ein neuer Wirkstoff als Add-on-Therapie zu L-Dopa oder in Kombination mit anderen Parkinson-Krankheit-Therapien zugelassen. Safinamid wirkt multimodal: Es hemmt die Monoaminoxidase-B, den Dopamin-Reuptake aus dem synaptischen Spalt, die Glutamatfreisetzung und hat zudem eine Wirkung auf spannungsabhängige Natrium-Kanäle sowie Calcium-Kanäle. Somit besitzt Safinamid eine dopaminerge und nicht-dopaminerge Wirkung; es soll insbesondere Dyskinesien und nicht-motorische Symptome verbessern sowie Wirkungsfluktuationen reduzieren (Stocchi and Torti, 2016).

Eine initiale Therapie mit Dopamin-Agonisten hat laut vergleichenden Studien mit L-Dopa den Vorteil, dass die Patienten unter Dopamin-Agonisten seltener Dyskinesien oder Wirkungsfluktuationen entwickeln (Oertel et al., 2006; Rascol et al., 2000). So sind motorische Fluktuationen und Dyskinesien nach 10 Jahren L-Dopa-Therapie bei fast allen Patienten zu erwarten (Deutsche Gesellschaft für Neurologie, 2016). Deswegen ist bei jüngeren Patienten ohne wesentliche Komorbidität laut der aktuellen Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Neurologie in der initialen Therapie den Dopamin-Agonisten der Vorzug zu geben (Deutsche Gesellschaft für Neurologie, 2016). Die meisten dieser Patienten werden im Verlauf L-Dopa für eine effektive Symptomkontrolle benötigen. Bei Patienten mit späterem Erkrankungsbeginn erfolgt die Therapieeinleitung dagegen in der Regel mit L-Dopa in Kombination mit einem Dopa-Decarboxylase-Inhibitor (Deutsche Gesellschaft für Neurologie, 2012; Worth, 2013). Um im späteren Krankheitsverlauf eine höhere Effektivität zu erreichen oder um Unverträglichkeiten durch höhere Dosen zu vermeiden, können die oben erwähnten

Medikamente auch kombiniert werden (Deutsche Gesellschaft für Neurologie, 2012; Worth, 2013). Trotz ausgefeilter Therapiepläne sind Dyskinesien und Wirkungsfluktuationen ein häufiges Problem mit zunehmender Dauer der Therapie (Lees et al., 2009). Um diesen Problemen entgegenzuwirken, gibt es die Möglichkeit anderer Applikationsformen, zum Beispiel die enterale Gabe von L-Dopa, oder auch nicht-medikamentöse Therapien, insbesondere die tiefe Hirnstimulation (Lees et al., 2009). Der am häufigsten gewählte Stimulationsort ist dabei der *Nucleus subthalamicus*, eine weitere Option ist die Stimulation des *Globus pallidus internus* (Deutsche Gesellschaft für Neurologie, 2012). Die Effektivität der tiefen Hirnstimulation ist gut belegt und insbesondere gut geeignet für Patienten mit einer Entwicklung von Dyskinesien im frühen Krankheitsverlauf (Deuschl et al., 2006; Schuepbach et al., 2013). Eine genaue Auswahl der Patienten ist allerdings essentiell, da auch teils gravierende Nebenwirkungen bekannt sind, wie Infektionen nach dem Einsetzen der Elektroden, eine Verminderung der Wortflüssigkeit und neuropsychiatrische Auffälligkeiten (Fily et al., 2011; Okun et al., 2012).

Die nicht-motorischen Symptome tragen wesentlich zur Verschlechterung der Lebensqualität eines Patienten mit einer Parkinson-Krankheit bei (Worth, 2013). Die Daten hinsichtlich der Effektivität spezifischer Therapien der nicht-motorischen Symptome sind allerdings limitiert (Worth, 2013). Als belegt gilt die Wirksamkeit von Pramipexol (ein Dopaminagonist) gegen depressive Symptome, von Clozapin (ein atypisches Neuroleptikum) gegen psychotische Symptome, von Rivastigmin (ein Cholinesterase-Hemmer) gegen demenzielle Symptome und von Botulinumtoxin bei Sialorrhoe (Seppi et al., 2011). Als wahrscheinlich effektiv eingestuft wird eine Therapie mittels Nortryptilin oder Desipramin (beides trizyklische Antidepressiva) gegen depressive Symptome und mit Macrogol (ein osmotisch wirkendes Laxans) gegen Obstipation (Seppi et al., 2011). Für weitere Therapieoptionen wurden in einem Übersichtartikel, welcher Studien bis Dezember 2010 einschloss, keine klaren Nutzenbelege beschrieben (Seppi et al., 2011). In einer doppelblinden, placebokontrollierten Studie aus dem Jahr 2011 zeigte sich eine signifikante Verbesserung von Schlafstörungen durch dopaminerge Therapie (Trenkwalder et al., 2011).

Ein weiterer wichtiger Bestandteil der Parkinsontherapie sind nicht-medikamentöse Therapien, wobei auch hier der Nutzen nur teilweise belegt ist (Deutsche Gesellschaft für Neurologie, 2012). Dazu zählen insbesondere Physiotherapie, Logopädie und Ergotherapie (Deutsche Gesellschaft für Neurologie, 2012; Worth, 2013). In späteren Krankheitsstadien sind meist eine spezielle pflegerische Versorgung und palliative Maßnahmen notwendig (Worth, 2013).

Zusammenfassend ist die Entwicklung neuer Therapien, welche den Verlauf der Erkrankung beeinflussen, dringend erforderlich (Deleersnijder et al., 2013).

Aufgrund der Bedeutung für die vorliegende Arbeit, soll im Folgenden noch einmal detaillierter auf die Bedeutung von Alpha-Synuklein und der Autophagie – insbesondere im Zusammenhang mit der Parkinson-Krankheit – eingegangen werden.

1.2 Alpha-Synuklein

1.2.1 Entdeckung/Namensgebung

Das Protein Alpha-Synuklein wurde entdeckt, als ein kleines Fragment von 35 Aminosäuren als Komponente der Amyloid-Ablagerungen bei der Alzheimer-Krankheit identifiziert wurde (Uéda et al., 1993). Dieses Fragment wurde deswegen als Nicht-Amyloid-beta-Komponente des Amyloids der Alzheimer-Krankheit (NAC, für Englisch: non-amyloid beta component of Alzheimer disease amyloid) bezeichnet und Alpha-Synuklein selbst konsequenterweise zunächst NAC-Vorgänger (NACP, für Englisch: precursor of NAC) genannt. Aufgrund der hohen Homologie zum Protein Synuklein des Rattengehirnes und Zitterrochens wurde es später in Alpha-Synuklein umbenannt (Jakes et al., 1994).

1.2.2 Struktur

Alpha-Synuklein ist ein kleines Protein bestehend aus 140 Aminosäuren; *SNCA* wird auf dem Chromosom 4q21 kodiert (Jakes et al., 1994; Spillantini et al., 1995). Das Alpha-Synuklein-Protein kann in drei Regionen mit unterschiedlichen strukturellen Eigenschaften eingeteilt werden (Beyer, 2006): Eine amphipathische N-terminale Domäne (Aminosäuren 1-60), eine hydrophobe zentrale Domäne (NAC-Domäne, Aminosäuren 61-95) und eine saure, Glutamat-reiche C-terminale Domäne (Aminosäuren 96-140) (Beyer, 2006; Abbildung 3). Die amphipathische N-terminale Domäne erinnert an lipidbindende Domänen von Apolipoproteinen, und neigt vermutlich genau wie diese bei Bindung an eine Phospholipid-Doppelschicht zur Formung von amphipathischen Alpha-Helices (Davidson et al., 1998). Die inzwischen fünf bekannten sinnverändernden Mutationen, die genetische Formen eines Parkinson-Syndroms hervorrufen, liegen in dieser Region und sprechen für eine bedeutende Rolle dieser Region hinsichtlich der Pathogenese (Venda et al., 2010). Die zentrale hydrophobe Region (non-amyloid-beta component- oder NAC-Domäne) wird als Ursache dafür angesehen,

dass Alpha-Synuklein zur Aggregation neigt und häufig fibrilläre Strukturen bildet (Giasson et al., 2001; Koo et al., 2009). Die saure C-terminale Domäne enthält fünfzehn negativ geladene Aminosäuren (zehnmal Glutamat und fünfmal Aspartat) sowie fünfmal Prolin und ist somit verantwortlich für die intrinsisch geringe Tendenz von Alpha-Synuklein eine organisierte Struktur auszubilden (Hoyer et al., 2004; Meuvius et al., 2010).

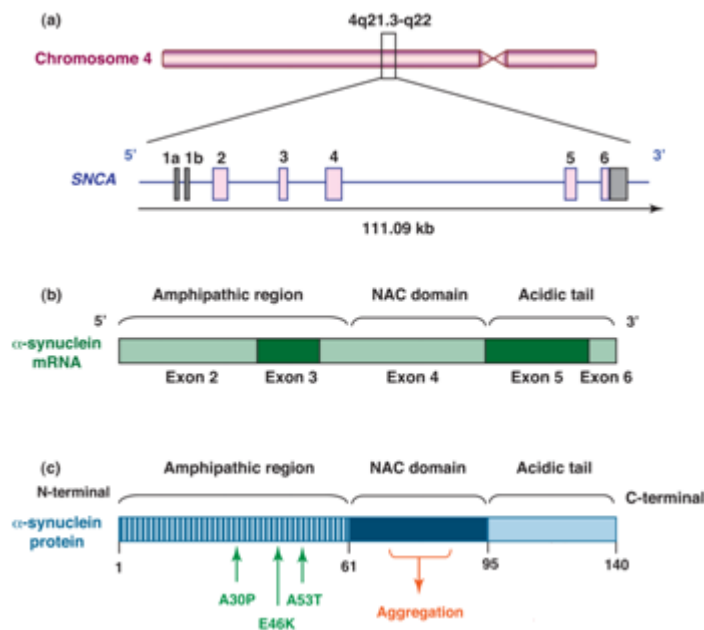


Abbildung 3 (aus Venda et al., 2010): Schematische Darstellung des humanen Alpha-Synukleins; (a) SNCA auf Chromosom 4, (b) Alpha-Synuklein-mRNA, (c) Alpha-Synuklein mit den drei Domänen: amphipathische N-terminale Domäne, hydrophobe zentrale Domäne (= NAC Domäne) und die saure C-terminale Domäne. Die grünen Pfeile kennzeichnen drei der neun bekannten sinnverändernden Mutationen.

Alpha-Synuklein gehört zur Gruppe der intrinsisch ungefalteten, nicht-strukturierten („disordered“) Proteine; das bedeutet, es fehlt eine gut organisierte Sekundärstruktur und damit auch eine Tertiärstruktur (Uversky, 2011). Proteine dieser Gruppe sind bekannt dafür mit einer Reihe von Partnern zu interagieren. So sind für Alpha-

Synuklein mehr als 50 Proteine als potentielle Bindungspartner identifiziert worden (Breydo et al., 2012; Uversky, 2011).

Allerdings muss bedacht werden, dass nicht exakt bekannt ist, wie sich Alpha-Synuklein innerhalb der Zelle verhält: Wie groß dort der Anteil an ungefaltetem Alpha-Synuklein ist und wie hoch der Anteil ist, der als Folge einer Bindung eine Sekundärstruktur einnimmt, ist ungeklärt (Deleersnijder et al., 2013).

Dass Alpha-Synuklein tatsächlich *in vivo* zu den ungefalteten, nicht-strukturierten Proteinen gehört, wurde allerdings kürzlich durch Studien angezweifelt, nach denen Alpha-Synuklein physiologischerweise als helikal gefaltetes Tetramer vorkommt (Bartels et al., 2011; Dettmer et al., 2013). Dieses Tetramer soll nicht zur Aggregation neigen (Bartels et al., 2011; Dettmer et al., 2013). Die Autoren gehen davon aus, dass die Destabilisierung dieser Tetramere einer Alpha-Synuklein-Fehlfaltung und -Aggregation den Synukleinopathien vorausgeht. Eine weitere Studie konnte zeigen, dass rekombinantes Alpha-Synuklein – unter nicht-denaturierenden Bedingungen aufgereinigt – auch *in vitro* stabile Tetramere bildet (Wang et al., 2011). Diese

Oligomere von Alpha-Synuklein sollen gegenüber einer Fibrillation widerstandsfähig sein, keine Poren in Zellmembranen formen und auch generell nicht toxisch für Zellen sein (Wang et al., 2011), im Gegensatz zu anderen vorher beschriebenen Alpha-Synuklein-Oligomeren, die Poren formen sollen und somit toxisch wirken (Danzer et al., 2007; Kim et al., 2009). Wie oben erwähnt, stehen diesen drei Studien eine Menge an Untersuchungen gegenüber, die Alpha-Synuklein als ungefaltetes Protein ansehen (Binolfi et al., 2012; Fauvet et al., 2012), sodass die Frage, ob Alpha-Synuklein physiologisch als ungefaltetes Protein oder als Tetramer vorliegt zur Zeit nicht entschieden ist (Deleersnijder et al., 2013).

1.2.3 Funktion von Alpha-Synuklein

Ebenso wie die physiologische Form von Alpha-Synuklein, ist auch die Funktion von Alpha-Synuklein weiterhin nicht vollständig entschlüsselt. Zwar exprimieren auch mehrere nicht-neuronale Zellen und Gewebe – zum Beispiel Erythrozyten – Alpha-Synuklein (Barbour et al., 2008), dennoch wird das Protein als relativ spezifisches Protein des Nervensystems angesehen (Iwai et al., 1995). Alpha-Synuklein wird in vielen Neuronenpopulationen des zentralen und peripheren Nervensystems exprimiert, was eine generelle Rolle innerhalb des Nervensystems suggeriert (Bendor et al., 2013). Dabei ist Alpha-Synuklein relativ spezifisch an den terminalen Nervenendigungen lokalisiert und es findet sich nur wenig Alpha-Synuklein im Zellkörper, dem Zellkern oder in extrasynaptischen Bereichen entlang von Axonen (George et al., 1995; Iwai et al., 1995). Passend zu der vornehmlich präsynaptischen Lokalisation von Alpha-Synuklein konnte gezeigt werden, dass Alpha-Synuklein an der synaptischen Transmission insbesondere durch Regulation des Vesikeltransports beteiligt ist (Abeliovich et al., 2000; Burré et al., 2010; Chandra et al., 2005; Larsen et al., 2006; Murphy et al., 2000; Yavich et al., 2005). Weitere beschriebene physiologische Funktionen umfassen unter anderem eine Beteiligung an der Regulation der Dopamin-Biosynthese, des Vesikeltransports zwischen endoplasmatischem Retikulum und Golgi-Apparat sowie unter bestimmten Bedingungen eine Rolle beim Überleben von Neuronen (Chandra et al., 2005; Cooper et al., 2006; Peng et al., 2005; Perez et al., 2002; Quilty et al., 2006; Tehranian et al., 2006). Diese große Anzahl an Funktionen wäre durchaus üblich für ein Protein aus der Gruppe der ungefalteten, nicht-strukturierten Proteine. Allerdings ist weiterhin unklar, wie entscheidend die oben aufgeführten Funktionen *in vivo* sind und ob tatsächlich bereits alle relevanten physiologischen Funktionen von Alpha-Synuklein erforscht sind (Bendor et al., 2013).

1.2.4 Bedeutung von Alpha-Synuklein für die Parkinson-Krankheit

Es gibt mehrere Hauptbeobachtungen, die für eine zentrale Rolle des Proteins Alpha-Synuklein bei der Entstehung der Parkinson-Krankheit bzw. bei der Entstehung eines Parkinson-Syndroms sprechen:

- a. Die Hauptkomponente der Lewy-Körperchen ist eine abnorme, posttranslational-modifizierte und aggregierte Form des Proteins Alpha-Synuklein (Fujiwara et al., 2002; Spillantini et al., 1997)
- b. 1997 berichteten Polymeropoulos und Kollegen, dass eine sinnverändernde Mutation im Alpha-Synuklein-Gen (A53T) zur Entwicklung eines genetischen Parkinson-Syndroms führt (Polymeropoulos et al., 1997). Inzwischen (Stand Juli 2017) sind neun sinnverändernde Mutationen des Alpha-Synuklein-Gens (A18T, A29S, A30P, E46K, H50Q, G51D, A53E, A53T und A53V) bekannt, welche mit der Auslösung eines Parkinson-Syndroms assoziiert werden (Appel-Cresswell et al., 2013; Hoffman-Zacharska et al., 2013; Krüger et al., 1998; Lesage et al., 2013; Pasanen et al., 2014; Polymeropoulos et al., 1997; Yoshino et al., 2017; Zarranz et al., 2004). Von diesen verursacht die am längsten bekannte und am besten untersuchte Mutation A53T ein autosomal-dominantes Parkinson-Syndrom mit einer geschätzt 90%igen Penetranz (Papadimitriou et al., 2016).
- c. Duplikationen und Triplikationen von *SNCA* führen zu einem autosomal-dominant vererbten genetischen Parkinson-Syndrom (Chartier-Harlin et al., 2004; Singleton et al., 2003). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass diese Gen-Multiplikationen direkt mit einer Zunahme an Alpha-Synuklein-mRNA im frontalen Kortex und mit erhöhten Konzentrationen im Blut korrelieren (Miller et al., 2004). Interessant ist, dass der Grad an Überexpression anscheinend mit der Schwere der Erkrankung zusammenhängt: Patienten mit *SNCA*-Triplikationen entwickeln im Vergleich zu Patienten mit *SNCA*-Duplikationen ein Parkinson-Syndrom mit früherem Krankheitsbeginn, sich rascher entwickelnden kognitiven Störungen, schwereren nicht-motorischen Symptomen, ausgeprägter Neurodegeneration und insgesamt schnellerer Krankheitsprogression (Chartier-Harlin et al., 2004; Farrer et al., 2004)
- d. GWAS, durchgeführt an Patienten mit der Parkinson-Krankheit als Fallgruppe, demonstrierten eine starke Assoziation zwischen häufigen Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNP, für Englisch: single nucleotide polymorphism) innerhalb des *SNCA* und der Parkinson-Krankheit (Simón-Sánchez et al., 2009). Diese Beobachtung

konnte durch Metaanalysen in mehreren Populationen mit hoher Signifikanz bestätigt werden; SNPs des *SNCA* sind also ein Risikofaktor für die Entwicklung der Parkinson-Krankheit (Edwards et al., 2010)

- e. In Tiermodellen, die auf der Überexpression von Alpha-Synuklein basieren, zeigen sich neuronale Lewy-Körperchen-ähnliche Alpha-Synuklein-Einschlüsse, eine progressive (dopaminerge) Neurodegeneration und in manchen Fällen sogar motorische Symptome, die der Parkinson-Krankheit ähneln (Löw and Aebischer, 2012; Whitworth, 2011). Zudem konnte in Zellkulturmodellen gezeigt werden, dass die Überexpression von Alpha-Synuklein dopaminerge Neurone anfälliger für toxische Reize macht oder sogar alleine zur Neurodegeneration führen kann (Höllerhage, Goebel et al., 2014; Winner et al., 2011; Zhou et al., 2000). Weiterhin führen die oben genannten Punktmutationen *in vivo* und *in vitro* ebenso wie andere künstlich erzeugte Mutationen im *SNCA* zu einer erhöhten Toxizität (Höllerhage, Goebel et al., 2014; Löw and Aebischer, 2012; Winner et al., 2011)

1.2.5 Aggregation und Pathogenität von Alpha-Synuklein

Dass Alpha-Synuklein eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Parkinson-Krankheit spielt, ist aus den oben genannten Gründen unbestritten. Zudem herrscht größtenteils Einigkeit darüber, dass nicht das Alpha-Synuklein-Monomer toxisch wirkt, sondern erst Aggregate aus fehlgefaltetem Alpha-Synuklein die neurodegenerative Wirkung entfalten (Winklhofer et al., 2008). Als Schlüsselereignis, welches zur Neurodegeneration führt, wird somit die ungewollte Aggregation von Alpha-Synuklein angesehen (Deleersnijder et al., 2013; Periquet et al., 2007; Shulman et al., 2011). Man nimmt an, dass diese Aggregation, die zur Bildung von Lewy-Körperchen und Lewy-Neuriten führt und schließlich in der Degeneration dopaminerg Neurone endet, mehrere Jahre benötigt (Ferris et al., 2013).

Unter gewissen, nicht vollständig geklärten Umständen interagieren die physiologischen Alpha-Synuklein-Formen und bilden präfibrilläre Alpha-Synuklein-Aggregate oder Protofibrillen, welche wiederum unlösliche Fibrillen formen können (Conway et al., 2000; Gosavi et al., 2002). Dieser pathogenetische Aggregationsprozess kann durch eine Reihe von endogenen und exogenen Faktoren beeinflusst werden; dazu zählen Schwermetalle, Pestizide, genetische Veränderungen von *SNCA*, Protein-Interaktionspartner und posttranslationale Modifikationen (Deleersnijder et al., 2013). So führen zum Beispiel Punktmutationen *in vitro* zu einer beschleunigten Aggregation von Alpha-Synuklein (Greenbaum et al., 2005; Li et al., 2001;

Rospigliosi et al., 2009). Zudem beeinflussen posttranslationale Veränderungen, wie zum Beispiel Oxidation, Nitrierung und Phosphorylierung, die Eigenschaften von Alpha-Synuklein zu aggregieren (Giasson et al., 2000; Hashimoto et al., 1999a, 1999b; Uversky, 2007). Auch erhöhte Konzentrationen an Alpha-Synuklein – wie bei *SNCA*-Duplikationen und -Triplikationen – erhöhen die Wahrscheinlichkeit der Oligomer- und Fibrillen-Bildung (Deleersnijder et al., 2013).

Allerdings ist weiterhin unklar, welche Form von Alpha-Synuklein die Neurodegeneration vermittelt. Der Hauptbestandteil der Lewy-Körperchen ist eine posttranslational modifizierte, fibrilläre Form von Alpha-Synuklein (Fujiwara et al., 2002; Spillantini et al., 1997; Trojanowski and Lee, 2003). Zunächst wurden deswegen fibrilläre Aggregate als die toxische Alpha-Synuklein-Form angesehen. Wie weiter oben bereits ausgeführt, sind Lewy-Körperchen allerdings auch in circa 10-15 % von bis zum Ableben neurologisch gesunden, älteren Individuen nachweisbar (Gibb and Lees, 1988). In *in vivo* Parkinson-Krankheit-Modellen gehen die phänotypischen Veränderungen häufig dem Nachweis fibrillären Alpha-Synukleins voraus oder treten sogar unabhängig von fibrillären Einschlüssen auf (Masliah et al., 2000). Zudem zeigten Untersuchungen, dass große Alpha-Synuklein-Aggregate eine protektive Wirkung entfalten können (Bodner et al., 2006; Garske et al., 2007; Tanaka et al., 2004). Daraus wurde die Hypothese abgeleitet, dass die Formierung von Lewy-Körperchen die Zellen schützen soll, und dementsprechend die fibrilläre Form von Alpha-Synuklein nicht die toxische Form von Alpha-Synuklein darstellt (Caughey and Lansbury, 2003; Tanaka et al., 2004). Aus dieser Hypothese entstand wiederum die Vermutung, dass fehlgefaltete Alpha-Synuklein-Oligomere, also präfibrilläre Alpha-Synuklein-Aggregate, die toxische Alpha-Synuklein-Form darstellen (Caughey and Lansbury, 2003; Walsh and Selkoe, 2004). Tatsächlich gibt es mehrere Studien, die diese Hypothese unterstützen: In einer Untersuchung konnte demonstriert werden, dass künstlich generierte Alpha-Synuklein-Mutanten zwar eine geringere Neigung zur Bildung von Fibrillen besitzen, aber stärker zur Bildung von löslichen Oligomeren neigen (Karpinar et al., 2009). Dabei korrelierte die Eigenschaft der Alpha-Synuklein-Mutanten lösliche Oligomere zu formen mit der Neurotoxizität *in vitro* und *in vivo* (Karpinar et al., 2009). In die gleiche Richtung deuten Ergebnisse von Winner und Kollegen, die zeigten, dass Alpha-Synuklein-Mutanten, die die Oligomer-Bildung fördern, zum dopaminergen Zellverlust in der *Substantia nigra* von Ratten führen (Winner et al., 2011). Noch weitere Untersuchungen konnten bestätigen, dass Alpha-Synuklein-Oligomere eine toxische Wirkung entfalten können (Danzer et al., 2007; Zhang et al., 2008). Dies wird unterstützt durch die Beobachtung, dass Alpha-Synuklein-Protofibrillen in Gehirnen von Patienten der Parkinson-Krankheit und Patienten mit DLB erhöht

waren (Sharon et al., 2003). Ohne dass bisher das genaue toxische Alpha-Synuklein-Oligomer bekannt ist, wird die Hypothese der toxischen Alpha-Synuklein-Oligomere im überwiegenden Anteil der Publikationen vertreten. Dementgegen steht eine Studie von Taschenberger und Kollegen, die wiederum eine erhöhte Toxizität durch die fibrilläre Form von Alpha-Synuklein im Vergleich zu den Oligomeren beobachteten (Taschenberger et al., 2012).

Die Suche nach der toxischen Alpha-Synuklein-Form wird zusätzlich dadurch erschwert, dass – wie oben beschrieben – bis zum jetzigen Zeitpunkt noch keine Einigkeit über die physiologische Form von Alpha-Synuklein herrscht.

Durch welche molekularen Mechanismen Alpha-Synuklein-Aggregate ihren Anteil an der Pathogenese haben, ist ebenso wenig endgültig geklärt. Ein möglicher toxischer Effekt von Alpha-Synuklein-Oligomeren könnte die Bildung von Poren oder Kanal-ähnlichen Strukturen sein, die dann zu unkontrollierter Membranpermeabilität führen (Danzer et al., 2007; Kostka et al., 2008). Alpha-Synuklein-Oligomere könnten jedoch auch durch Membran-Destabilisierung und Membran-Disruption toxisch wirken (Reynolds et al., 2011; van Rooijen et al., 2010). Weiterhin wurde diskutiert, dass nicht eine spezielle Konformation der Oligomere, sondern der Aggregations-Prozess an der Zellmembran selbst durch Extraktion von Lipiden aus der Zellmembran membrandestabilisierend wirkt (Reynolds et al., 2011). Andere diskutierte molekulare Mechanismen, durch die Alpha-Synuklein-Aggregate zytotoxisch wirken sollen, beinhalten unter anderem eine Störung des Proteasom-Systems, eine Schädigung von Mitochondrien, eine Apoptose-Einleitung, eine Sensitivierung für oxidativen Stress, eine Störung der Autophagie und Defekte des vesikulären Transports (Deleersnijder et al., 2013). Wobei – wie oben bereits erwähnt – unklar bleibt, ob diese zellulären Veränderungen zur Alpha-Synuklein-Aggregation führen oder ob die Alpha-Synuklein-Aggregation diese intrazellulären Funktionsstörungen bedingt (Shulman et al., 2011).

Ein neuer Aspekt in der Pathogenese der Parkinson-Krankheit im Zusammenhang mit Alpha-Synuklein ist die Hypothese, dass eine Zell-zu-Zell-Ausbreitung von Alpha-Synuklein-Pathologie ähnlich pathologischer Prion-Proteine bei Prionerkrankungen in der Pathophysiologie der Parkinson-Krankheit eine Rolle spielen könnte. Diese Hypothese hat sich erst in den letzten Jahren entwickelt: Auslöser war die Entdeckung, dass embryonale mesencephalische Neurone, die in das Striatum von Parkinson-Patienten implantiert worden waren, 11-16 Jahre nach der Transplantation Lewy-Körperchen ausbildeten (Kordower et al., 2008; Li et al., 2008). Anscheinend hatte also eine Übertragung der Alpha-Synuklein-Pathologie vom Host zum Graft stattgefunden. Die Zell-zu-Zell-Transmission von Alpha-Synuklein-Monomeren, -Oligomeren und -Fibrillen konnte in der Folge in mehreren *in vivo*-Studien überzeugend demonstriert

werden (Desplats et al., 2009; Hansen et al., 2011; Luk et al., 2012; Masuda-Suzukake et al., 2013). Der genaue Übertragungsmechanismus ist dabei unklar: Diskutiert werden Exozytose und Endozytose, transzelluläre Ausbreitung via Tunnel-ähnlicher Gebilde oder – zumindest bei Monomeren – auch eine Ausbreitung mittels einfacher Diffusion (Ahn et al., 2006; Desplats et al., 2009; Gousset et al., 2009; Hansen et al., 2011; Lee et al., 2008; Volpicelli-Daley et al., 2011). Neben der reinen Übertragung konnten zudem auch damit einhergehende krankhafte Veränderungen, wie eine Reduktion des Dopamins, Neurodegeneration oder auch motorische Defizite beobachtet werden (Luk et al., 2012; Volpicelli-Daley et al., 2011). Diese Beobachtungen führten zu der Hypothese, dass Alpha-Synuklein ein prionähnliches Protein sein könnte, welches von betroffenen Neuronen auf gesunde Zellen übertragen werden kann und dabei den neurodegenerativen Prozess ausweitet (Olanow and Prusiner, 2009; Recasens and Dehay, 2014). Diese Theorie wäre durchaus im Einklang mit der oben beschriebenen stadienartigen und strukturierten Ausbreitung der Pathologie nach Braak und Kollegen (Deleersnijder et al., 2013; Recasens and Dehay, 2014). Wichtig ist allerdings festzuhalten, dass es bislang keine epidemiologischen Hinweise auf eine direkte Mensch-zu-Mensch-Übertragbarkeit der Parkinson-Krankheit gibt, wie es für Prionerkrankungen charakteristisch ist (Beekes et al., 2014; Recasens and Dehay, 2014).

1.3 Autophagie

In den letzten Jahren wurde ein verstärktes Augenmerk auf die Rolle der Autophagie im Zusammenhang mit der Parkinson-Krankheit gelegt, erstens im Rahmen der Pathogenese und zweitens als möglichem therapeutischen Ansatz. So wurde sowohl in Gehirnen von Patienten der Parkinson-Krankheit als auch in Tiermodellen der Parkinson-Krankheit eine Störung der Autophagie nachgewiesen (Chu et al., 2009; Xiong et al., 2013).

1.3.1 Grundlagen der Autophagie

Die Autophagie ist ein evolutionär hochkonservierter Prozess der zellulären Homöostase, der essentiell für den Abbau zytoplasmatischer Bestandteile in eukaryotischen Zellen ist (Lynch-Day et al., 2012). Dazu gehört vor allem der Abbau langlebiger Proteine und Proteinaggregate sowie der Abbau dysfunktionaler oder überflüssiger Organellen (Lilienbaum, 2013; Ravikumar et al., 2002). Die Autophagie ist der alternative Abbauweg neben dem Abbau von Proteinen durch das Ubiquitin-Proteasom-System und wurde in den 1960er Jahren entdeckt (Deter and

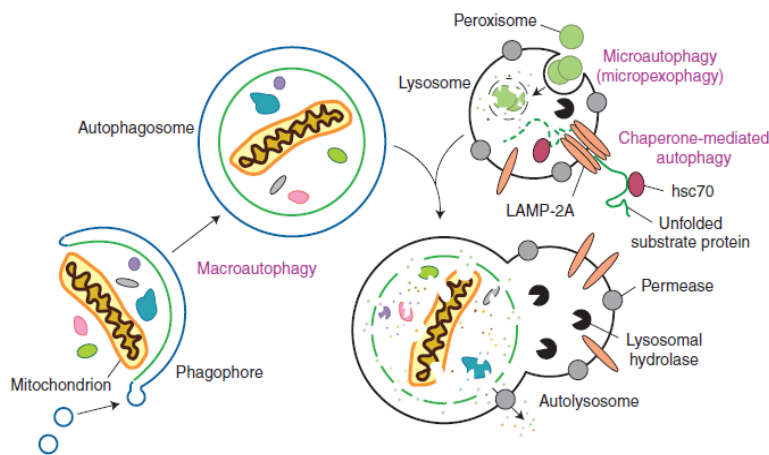


Abbildung 4 (aus Lynch-Day et al., 2012): Schematische Darstellung der drei Hauptarten der Autophagie, Makroautophagie, Mikroautophagie und Chaperonen-vermittelte Autophagie.

De Duve, 1967; Deter et al., 1967; Lynch-Day et al., 2012). Proteine mit einer kurzen Halbwertszeit werden in der Regel durch das Ubiquitin-Proteasom-System abgebaut; die meisten zytosolischen Proteine mit einer langen Halbwertszeit werden dagegen mit Hilfe der Transportmechanismen der

Autophagie innerhalb der Lysosomen abgebaut (Cuervo et al., 2004; Lilienbaum, 2013).

In Abhängigkeit vom Transportmechanismus ins Lysosom werden drei Hauptarten der Autophagie unterschieden: Makroautophagie, Mikroautophagie und Chaperonen-vermittelte Autophagie (Lynch-Day et al., 2012; Abbildung 4).

Bei der Chaperonen-vermittelten Autophagie (CMA) erkennt ein Chaperonprotein namens Hsp70 (Hitzeschockprotein mit einem Molekulargewicht von 70 kDa) ein zytosolisches Protein anhand einer bestimmten Pentapeptid-Sequenz, dem KFERQ-Motiv oder einem KFERQ-ähnlichen Motiv (Kaushik and Cuervo, 2008). Anschließend entfaltet Hsp70 das gebundene Protein und führt es zum Lysosom (Kaushik and Cuervo, 2008). Mit Hilfe von LAMP-2a (für Englisch: lysosomal-associated membrane proteins 2a) erfolgt die Bindung an das Lysosom und der Transport des Proteins über die lysosomale Membran ins Lysosom, wo letztendlich der Abbau erfolgt (Kaushik and Cuervo, 2008).

Die Mikroautophagie beschreibt die direkte Aufnahme von zytosolischem Material ins Lysosom durch Einstülpung der lysosomalen Membran (Kunz et al., 2004).

Die Makroautophagie ist der wichtigste lysosomale Abbauweg für intrazytoplasmatische Proteine und nach wie vor der am besten charakterisierte der drei Autophagietypen (Lynch-Day et al., 2012; Winslow et al., 2010). Bei der Makroautophagie wird ein Teil des Zytoplasmas von einer Doppelmembran umschlossen. Diese sogenannten Phagophoren vergrößern sich und werden dann Autophagosom genannt. Das Autophagosom fusioniert anschließend mit einem Lysosom, woraufhin der Inhalt des Autophagosoms von lysosomalen Enzymen abgebaut und recycelt wird (Klionsky, 2005; Shintani and Klionsky, 2004). Im Gegensatz zum Ubiquitin-

26S-Proteasom-System kann die Makroautophagie große Mengen an zytoplasmatischem Inhalt abbauen sowie komplette Organellen (Shintani and Klionsky, 2004).

Da in der vorliegenden Doktorarbeit nur die Makroautophagie untersucht wurde, wird im restlichen Text Makroautophagie in der Regel lediglich als Autophagie bezeichnet. Häufig wird die Autophagie als ein nicht-selektiver Mechanismus beschrieben, obwohl auch gezielt beschädigte bzw. überflüssige Organellen oder fehlgefaltete bzw. aggregierte Proteine degradiert werden (Lynch-Day et al., 2012). Autophagie wurde lange Zeit als rein adaptive Antwort auf Nährstoffmangel, geringe Sauerstoffkonzentration und verminderte Energieversorgung angesehen, denn das Resultat der Autophagie ist die Freisetzung der Abbauprodukte – insbesondere Aminosäuren – ins Zytoplasma, die dann essentiellen Stoffwechselvorgängen zur Verfügung stehen (Lynch-Day et al., 2012). Allerdings zeigte sich, dass eine basale, konstitutive Autophagie essentiell für das Überleben von Neuronen ist (Hara et al., 2006; Komatsu et al., 2006). So ergaben Studien, dass ein Fehlen der Autophagie zur Akkumulation von abnormalen Proteinen und zur Neurodegeneration führt (Hara et al., 2006; Komatsu et al., 2006).

1.3.2 Verbindungen zwischen Autophagie und der Parkinson-Krankheit sowie genetischen Formen eines Parkinson-Syndroms

Allein die Funktion der Autophagie, nämlich insbesondere der Abbau von Proteinaggregaten, lässt an eine Beteiligung an der Pathogenese von neurodegenerativen Erkrankungen denken, denn die meisten neurodegenerativen Erkrankungen inklusive der Parkinson-Krankheit zeigen charakteristische Proteinaggregate als Pathologie auf zellulärer Ebene. Tatsächlich deuten mehrere Ergebnisse aus Untersuchungen auf eine Rolle der Autophagie an der Pathogenese der Parkinson-Krankheit bzw. an der Pathogenese von genetischen Formen eines Parkinson-Syndroms hin: In *post mortem* Gehirnen von Patienten der Parkinson-Krankheit und DLB-Patienten konnte eine Vermehrung von Autophagosomen gefunden werden (Anglade et al., 1997; Klucken et al., 2012; Yu et al., 2009). Weiterhin zeigte sich in *post mortem* Gehirnen von Parkinson-Patienten, dass die intrazelluläre Alpha-Synuklein-Aggregation in nigralen Neuronen mit einer lysosomalen Dysfunktion assoziiert ist (Chu et al., 2009). Auch in Tier- und Zellkulturmodellen der Parkinson-Krankheit konnte eine Veränderung der Autophagie im Rahmen der Pathogenese beobachtet werden (Cuervo et al., 2004; Xiong et al., 2013). *PARK2*, *PARK6* und *LRRK2* sind allesamt Gene, die bei Mutationen zu einer genetischen Form eines Parkinson-Syndroms führen können (Gasser, 2009). Für die Genprodukte von *PARK2* und

PARK6 konnte eine Beteiligung am selektiven Abbau von Mitochondrien durch Autophagie nachgewiesen werden (Narendra et al., 2008, 2010). Zudem führen Mutationen von *LRRK2* zu einer Störung der Autophagie und einer Akkumulation von Markern der Autophagie (Alegre-Abarrategui et al., 2009). Zusammenfassend spricht vieles für eine bedeutende Rolle der Autophagie in der Pathogenese der Parkinson-Krankheit.

1.3.3 Autophagie und Alpha-Synuklein

Nicht nur für eine Verbindung zwischen der Parkinson-Krankheit und Autophagie gibt es mehrere Hinweise, sondern auch für eine direkte Verbindung zwischen der Autophagie und Alpha-Synuklein. Allerdings sind in diesem Zusammenhang mehrere wichtige Fragen Gegenstand von Diskussionen und nicht endgültig geklärt:

So ist offen, ob eine Aktivierung der Autophagie zu einer Protektion im Zusammenhang mit Synukleinopathien oder zu einer vermehrten Toxizität führt. Mehrere Studien konnten einen Schutz in Parkinson-Krankheit-Modellen durch Aktivierung der Autophagie beobachten (Dadakhujiev et al., 2010; Hebron et al., 2013; Spencer et al., 2009; Steele et al., 2013), wohingegen andere Forscher einen gegenteiligen Effekt – nämlich vermehrte Toxizität durch Aktivierung der Autophagie – sahen (Choubey et al., 2011; Li et al., 2011). In diesem Zusammenhang ist insbesondere wichtig zu klären, ob die Stimulation der Autophagie einen möglichen therapeutischen Ansatz in der Bekämpfung der Parkinson-Krankheit darstellt oder nicht. Wie oben erwähnt, ist nach wie vor keine Therapie bekannt, die den Progress der Parkinson-Krankheit wirkungsvoll verzögert; somit ist ein wichtiges Ziel der Parkinson-Forschung die Entwicklung neuer wirksamer Therapien (Worth, 2013). Dabei wird die Aktivierung der Autophagie häufig als verheißungsvoller Mechanismus genannt (Hebron et al., 2013; Park et al., 2014; Steele et al., 2013), wobei die Studien, die eine vermehrte Toxizität beobachteten, dem entgegenstehen (Choubey et al., 2011; Li et al., 2011).

Desweiteren ist offen, ob Alpha-Synuklein durch Autophagie abgebaut wird. Nach der Entdeckung von Alpha-Synuklein als entscheidendem Protein in der Pathogenese der Parkinson-Krankheit gab es mehrere Berichte, die dem Proteasom die entscheidende Rolle im Abbau von Alpha-Synuklein zuwiesen (Bennett et al., 1999; Tofaris et al., 2001). Andere Arbeiten konnten im Gegensatz dazu aber keinen Beitrag des Proteasoms am Alpha-Synuklein-Abbau beobachten (Ancolio et al., 2000; Paxinou et al., 2001; Rideout et al., 2001). In der Folge mehrten sich die Studien, die eine Mitbeteiligung oder sogar den hauptsächlichen Beitrag des Abbaus von Alpha-Synuklein durch die Autophagie beschrieben (Klucken et al., 2012; Lee et al.,

2004; Paxinou et al., 2001; Webb et al., 2003). Sollte Alpha-Synuklein durch Autophagie abgebaut werden, bleibt weiterhin umstritten, welche Form der Autophagie einen wie großen Anteil am Abbau leistet und insbesondere welche Alpha-Synuklein-Formen (Monomere, Oligomere, Fibrillen, größere Aggregate) durch welche Form der Autophagie abgebaut werden. Zum Beispiel sahen Webb und Kollegen eine Beteiligung sowohl des Ubiquitin-Proteasom-Systems als auch der Autophagie (Webb et al., 2003); eine andere Studie beobachtete nur einen minimalen Einfluss des Proteasoms sowie der Makroautophagie auf den Alpha-Synuklein-Abbau und stattdessen einen großen Beitrag der CMA am Alpha-Synuklein-Abbau (Cuervo et al., 2004). Passend dazu besitzt Alpha-Synuklein eine 15-Aminosäuren-lange Sequenz, die aus Variationen des KFERQ-Motivs besteht, welches dem Chaperon Hsp70 als Erkennungssequenz dient (Cuervo et al., 2004). Eine andere Untersuchung wiederum beschrieb in neuronalen Zellen neben der CMA die Makroautophagie als entscheidenden Abbauweg und sah keinen relevanten Beitrag des Proteasoms (Vogiatzi et al., 2008). Als Ursache für die unterschiedlichen Ergebnisse wurde dabei die Verwendung von unterschiedlichen Zellen verantwortlich gemacht (Vogiatzi et al., 2008). Allen drei Studien ist gemein, dass hauptsächlich der Abbau der Alpha-Synuklein-Monomere betrachtet wurde. Sowohl der Abbau von Alpha-Synuklein-Oligomeren als auch von -Monomeren wurde dagegen von Lee und Kollegen erforscht: Dabei wurde ein Beitrag des lysosomalen Abbauwegs am Abbau der Oligomere, nicht aber am Monomer-Abbau beobachtet (Lee et al., 2004). Der lysosomale Abbau der Oligomere soll in dieser Studie allerdings nicht durch Makroautophagie, sondern durch einen alternativen lysosomalen Abbauweg bedingt gewesen sein, womöglich also durch CMA. Im Gegensatz dazu beobachtete eine Forschergruppe eine Akkumulation von Alpha-Synuklein-Oligomeren durch Blockade der Makroautophagie (Yu et al., 2009). Zusammenfassend ist also nicht abschließend geklärt, wie groß der Beitrag der drei Autophagie-Formen ist und welche Alpha-Synuklein-Form durch welchen genauen Abbauweg degradiert wird.

Eine dritte offene Frage hinsichtlich Autophagie und Alpha-Synuklein ist, ob Alpha-Synuklein selbst aktivierend oder hemmend auf die Autophagie wirkt. Manche Studien beschreiben eine Inhibierung der Autophagie durch Alpha-Synuklein (Winslow and Rubinsztein, 2011; Winslow et al., 2010), wohingegen andere Arbeiten eine Aktivierung der Autophagie durch Alpha-Synuklein beobachteten (Choubey et al., 2011; Stefanis et al., 2001; Xilouri et al., 2009).

1.4 Ziel der Arbeit

Es gibt weiterhin keine Medikamente, die den Progress der Parkinson-Krankheit verlangsamen oder gar aufhalten können (Worth, 2013). Somit ist die Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze ein zentraler Bestandteil der Parkinson-Krankheit-Forschung. In unserer Arbeitsgruppe wurde ein neues Zellkulturmodell der Parkinson-Krankheit entwickelt, in welchem die Überexpression des Alpha-Synuklein-Wildtyps durch adenovirale Transduktion zum Zelltod von humanen, postmitotischen, dopaminergen Neuronen (LUHMES-Zellen) führt (Höllerhage, Goebel et al., 2014).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu untersuchen, ob Trifluoperazin, ein bekannter Aktivator der Makroautophagie in Neuronen, diese dopaminergen Zellen vor Wildtyp-Alpha-Synuklein-induzierter Toxizität schützen kann.

Wie oben dargelegt, gibt es noch mehrere Unklarheiten bezüglich der Beziehung zwischen Alpha-Synuklein und Autophagie. Es sollte deswegen zudem erforscht werden, welche Auswirkungen eine Aktivierung der Autophagie auf einzelne Alpha-Synuklein-Formen hat, und ob die Überexpression von Alpha-Synuklein in diesem Modell zu einer Hemmung oder Aktivierung der Autophagie führt.

2 Material und Methoden

Für die Experimente zur Neuroprotektion wurde ein Zellkulturmodell der Parkinson-Krankheit verwendet, welches auf der Überexpression des Alpha-Synuklein-Wildtyps beruht und in unserer Arbeitsgruppe entwickelt wurde (Höllerhage, Goebel et al., 2014). Es folgt eine Beschreibung des Zellkulturmodells.

2.1 Zellkulturmodell der Parkinson-Krankheit

2.1.1 Zelllinie

Alle Experimente wurden mit Lund human mesencephalic (LUHMES)-Zellen durchgeführt. Diese Zellen wurden an der Universität Lund (Lund, Schweden) generiert und uns freundlicherweise für Experimente zur Verfügung gestellt. Es folgt eine kurze Beschreibung der Generierung der Zelllinie an der Universität Lund: Die Entwicklung der Zellen in Lund begann durch Heraus-Präparation aus 8-Wochen-altem menschlichen Gewebe aus dem ventralen Mesencephalon (Lotharius et al., 2002). Die Prozedur erfolgte gemäß dem nationalen schwedischen Gesetz und mit der Genehmigung der Ethikkommission der Universitätsklinik Lund (Lotharius et al., 2002). Nach dem Herauslösen von Zellen aus dem mesencephalischen Gewebe wurden die Zellen immortalisiert, indem das virale Onkogen v-myc mittels eines retroviralen Vektors (LINX v-myc) in die Zellen eingefügt wurde (Hoshimaru et al., 1996; Lotharius et al., 2002). In diesem System aktiviert ein Tetracyclin-kontrollierter Transaktivator die Transkription von v-myc in der Abwesenheit von Tetracyclin, was wiederum zur Proliferation der Zellen führt (Hoshimaru et al., 1996; Lotharius et al., 2002). Hingegen führen geringe, nicht-toxische Konzentrationen an Tetracyclin zu einer fast vollständigen Blockade dieser Expressionsaktivierung durch den Transaktivator und erlauben somit die Differenzierung der Zellen (Hoshimaru et al., 1996; Lotharius et al., 2002). Durch weitere Selektion der mesencephalen Zellen wurde in Lund der Zellklon MESC 2.10 (für Englisch: mesencephalic cells 2.10) gewonnen und für weitere Experimente ausgewählt, da er dopaminerge Markerproteine, wie zum Beispiel die Tyrosin-Hydroxylase, exprimiert (Lotharius et al., 2002). Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten LUHMES-Zellen sind ein Subklon von MESC 2.10. Ebenso wie MESC 2.10 differenzieren sie nach Zugabe von Tetracyclin, Dibutyryl-cAMP (db-cAMP) und rekombinantem, humanem von Gliazellen abgeleitetem neurotrophem Faktor (GDNF) zu Zellen, die morphologisch und biochemisch gereiften dopaminergen Neuronen stark ähneln (Lotharius et al., 2005). Sie zeigen unter anderem eine intensive beta-III-Tubulin-Immunoreaktivität als Marker für neuronale Zellen, bilden neuronale Fortsätze aus, setzen

Dopamin frei und exprimieren mit der Tyrosin-Hydroxylase sowie der Dopa-Decarboxylase zwei wichtige Enzyme der Dopamin-Synthese (Höllerhage, Goebel et al., 2014; Lotharius et al., 2005).

2.1.2 Vorbehandlung der Zellkulturflaschen und der 48-Well-Platten (Coating)

Die Zellen wurden in Zellkulturflaschen der Firma Nunclon (Nunclon DELTA surface, 80 cm², Life Technologies, Waltham, MA, USA) kultiviert und alle Experimente wurden mit 48-Well-Zellkulturplatten (Nunclon DELTA surface, Life Technologies) durchgeführt.

Um die Zelladhärenz zu verbessern, wurden die Zellkulturflaschen zunächst mit Poly-L-Lysin Hydrobromid (PLL, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) vorbehandelt. Dazu wurde PLL zu einer Konzentration von 0,1 mg/ml in steril gefiltertem, destilliertem Wasser aufgelöst. Die Zellkulturflaschen wurden dann mit 7 ml des 0,1 mg/ml konzentrierten PLL befüllt und im Kühlschrank bei 4 °C über Nacht gelagert. Anschließend wurde das PLL abpipettiert und die Flaschen dreimal mit Dulbeccos phosphatgepufferter Salzlösung (PBS, Life Technologies) gewaschen.

Um während der Experimente eine noch bessere Zelladhärenz zu gewährleisten, wurde die Vorbehandlung der 48-Well-Platten um Fibronectin (Sigma-Aldrich) ergänzt. Fibronectin wurde zu einer Konzentration von 5 µg/ml in steril gefiltertem destilliertem Wasser aufgelöst. Auch bei dieser Vorbehandlung wurden die 48-Well-Platten zunächst mit 200 µl 0,1 mg/ml konzentriertem PLL pro Well befüllt. Anschließend wurden die Platten über Nacht bei 4 °C aufbewahrt. Am nächsten Tag wurde das PLL entfernt und die Wells dreimal mit PBS gewaschen. Dann erfolgte die Befüllung der Wells mit 200 µl 5 µg/ml konzentriertem Fibronectin. Im Anschluss wurden die Platten für mindestens 6 Stunden in den Inkubator (37 °C, 5 % CO₂) gestellt. Daraufhin wurden die Wells noch einmal mit PBS gewaschen und vor der Verwendung luftgetrocknet.

2.1.3 Kultivierung der Zellen

Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient F-12 Ham (DMEM/F-12)	Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA
100x N-2-Supplement	Life Technologies, Waltham, MA, USA
Rekombinanter humaner basischer Fibroblastenwachstumsfaktor (bFGF)	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA

Tabelle 1: Bestandteile des Wachstumsmediums

Zunächst wurden 25 µg bFGF in 1 ml PBS entsprechend einer Konzentration von 25 µg/ml aufgelöst. Dann wurde das Wachstumsmedium hergestellt (siehe auch Tabelle 1): Für 100 ml des Wachstumsmediums wurden 99 ml DMEM/F-12, 1 ml von 100-fach konzentriertem N-2-Supplement und 160 µl 25 µg/ml konzentriertem bFGF zusammengemischt und anschließend filtriert. N-2-Supplement wurde also 1-fach konzentriert verwendet und die finale Konzentration von bFGF im Wachstumsmedium betrug 0,04 µg/ml. Die Zellen wurden in 11 ml Wachstumsmedium in Zellkulturflaschen im Brutschrank (37 °C, 5 % CO₂-Konzentration, 100 % Luftfeuchtigkeit) kultiviert. Bei Erreichen der Zellkonfluenz erfolgte die Passagierung der Zellen. Dazu wurde das Wachstumsmedium entfernt und in 50-ml-Röhrchen gesammelt. In die Zellkulturflasche wurden dann 2 ml einer 1-fach konzentrierten Trypsin/EDTA-Lösung (0,05 %/0,02 %, Merck Millipore, Billerica, MA, USA) gegeben. Mit dieser Lösung wurden die Zellen für 5 Minuten im Brutschrank inkubiert, um sie anschließend nach Entfaltung der enzymatischen Wirkung von Trypsin von der Zellkulturflasche ablösen zu können. In der Zwischenzeit wurde das zuvor gesammelte Wachstumsmedium bei 1200 U/min zentrifugiert. Nach Ablauf der 5 Minuten wurden 7 ml des Überstandes des zentrifugierten Wachstumsmediums und 1 ml fetales Rinderserum (FBS, für Englisch: fetal bovine serum, Sigma-Aldrich) zu den 2 ml der Trypsin/EDTA-Lösung in die Zellkulturflasche pipettiert. Das FBS diente dabei zur Unterbindung der enzymatischen Wirkung von Trypsin. Daraufhin wurden die abgelösten Zellen inklusive der Flüssigkeit mit einer Pipette aufgenommen und in einem 50-ml-Röhrchen für 7 Minuten bei 1200 U/min zentrifugiert. Der gesamte Überstand wurde entsorgt und die Zellen in neuem Wachstumsmedium resuspendiert. Anschließend erfolgte die Zählung der Zellen in einer Neubauer-Zählkammer (Erläuterung siehe unten) und anschließend je nach Bedarf die Weiterkultivierung in Zellkulturflaschen, das Einfrieren der Zellen oder das Aussähen der Zellen in 48-Well-Platten für Experimente.

2.1.4 Aussähen der Zellen für Experimente

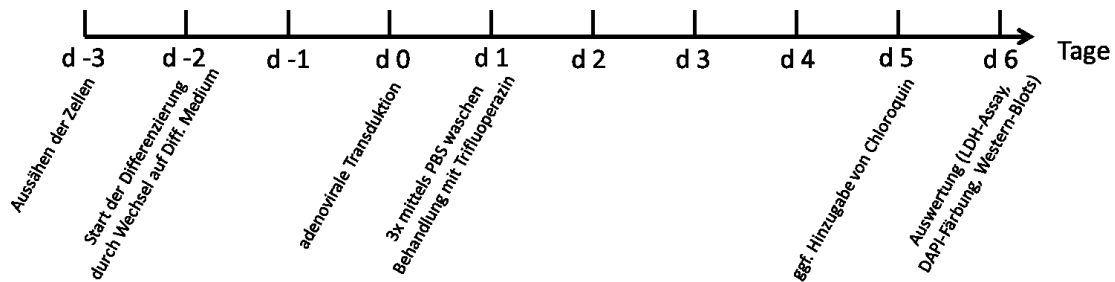


Abbildung 5: Zeitleiste zur Darstellung des experimentellen Designs. Die Tage sind in Bezug zum Zeitpunkt der adenoviralen Transduktion angegeben (d 0): Drei Tage vor der Transduktion wurden die Zellen ausgesät (d -3), einen Tag später erfolgte die Initiierung der Differenzierung durch Wechsel auf das Differenzierungsmedium (d -2). An d 0 wurden die Zellen transduziert, einen Tag später erfolgte nach drei Waschvorgängen die Behandlung mit Trifluoperazin (d 1) und sechs Tage nach der Transduktion wurde die Auswertung der Experimente durchgeführt (d 6). Bei den Experimenten, in denen auch Chloroquin verwendet wurde, erfolgte fünf Tage nach etwaiger Transduktion die Hinzugabe von Chloroquin (d 5).

Alle Experimente wurden in 48-Well-Zellkulturplatten durchgeführt. Für alle im Folgenden beschriebenen Experimente wurden maximal bis zur Passage zehn kultivierte Zellen verwendet. Der zeitliche Ablauf der Experimente gestaltete sich wie in Abbildung 5 dargestellt. Die Zellen wurden – wie oben beschrieben – von den Zellkulturflaschen abgelöst und anschließend in einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Dazu wurde nach dem Resuspendieren der Zellen in Wachstumsmedium 40 µl dieser Zellsuspension mit 40 µl Trypanblau (0,4 %, Life Technologies/Invitrogen) gemischt. Mit dieser Lösung wurde eine Neubauer-improved-Zählkammer befüllt. Trypanblau wurde zur Färbung verwendet, da damit eine Unterscheidung zwischen vitalen und abgestorbenen Zellen möglich ist: Vitale Zellen sind nicht permeabel für Trypanblau, abgestorbene Zellen nehmen dagegen Trypanblau auf und färben sich entsprechend. Unter dem Mikroskop wurden in zwei Großquadranten entsprechend einem Volumen von jeweils 0,1 µl die vitalen Zellen ausgezählt. Bei Multiplikation der gezählten Zellzahl mit 10.000 erhielt man also die Zellzahl pro ml in der Zellsuspension. Das Aussähen der Zellen erfolgte mit einer Dichte von 60.000 Zellen in 300 µl Medium pro Well entsprechend einer Zelldichte von circa 55.000/cm² bei einer Fläche von 1,1 cm²/Well.

2.1.5 Wechsel auf Differenzierungsmedium

Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient F-12 Ham (DMEM/F-12)	Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA
100x N-2 Supplement	Life Technologies, Waltham, MA, USA
Tetracyclin Hydrochlorid	Sigma-Aldrich
Rekombinanter humaner von Gliazellen abgeleiteter neurotropher Faktor (GDNF, für Englisch: glial cell-derived neurotrophic factor)	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
N ⁶ ,2'-O-Dibutyryladenodin 3',5'-zyklisches Monophosphat (db-cAMP)	Sigma-Aldrich

Tabelle 2: Bestandteile des Differenzierungsmediums

Zur Erstellung des Differenzierungsmediums mussten zunächst Tetracyclin, db-cAMP und GDNF (Tabelle 2) in Lösung gebracht werden. Tetracyclin wurde in steril gefiltertem, destilliertem Wasser zu einer Konzentration von 1 mg/ml aufgelöst. Db-cAMP wurde ebenso in steril gefiltertem, destilliertem Wasser gelöst, sodass eine Lösung mit einer Konzentration von 49 mg/ml entstand. Von GDNF wurde eine Lösung mit der Konzentration von 5 µg/ml in sterilem PBS hergestellt. Für 100 ml des Differenzierungsmediums wurden dann 98 ml an DMEM/F12, 1 ml des 100-fach-konzentrierten N-2-Supplement, 100 µl der 1 mg/ml-konzentrierten Tetracyclin-Lösung (entsprechend einer finalen Konzentration von 1 µg/ml), 1 ml der 49 mg/ml-konzentrierten db-cAMP-Lösung (entsprechend einer finalen Konzentration von 0,49 mg/ml) und 40 µl der 5 µg/ml-konzentrierten GDNF-Lösung (entsprechend einer finalen Konzentration von 2 ng/ml) gemischt. Anschließend wurde das Differenzierungsmedium filtriert.

Nach Aussähen der Zellen für die Experimente in 300 µl Wachstumsmedium pro Well, wurde das Wachstumsmedium nach dem Ablauf von 24 Stunden in den 48-Well-Platten durch 300 µl Differenzierungsmedium ersetzt. Wie oben bei der Beschreibung der Zelllinie erwähnt, wird durch die Bestandteile des Differenzierungsmediums die Expression von v-myc gestoppt und die Differenzierung der Zellen eingeleitet. Diese postmitotischen Zellen besitzen dann große morphologische und biochemische Ähnlichkeiten zu dopaminergen Neuronen. Dies konnte in unserer Arbeitsgruppe bestätigt werden: So nimmt die Expression von Proliferationsmarkern ab und die Expression von dopaminergen Markern, unter anderem der Tyrosin-Hydroxylase und der Dopa-Decarboxylase, deutlich zu (Höllerhage, Goebel et al., 2014, supplements).

2.1.6 Transduktion mittels adenoviraler Vektoren zur Überexpression von Alpha-Synuklein

Adenoviraler Vektor, der die cDNA von Alpha-Synuklein unter der Kontrolle eines Zytomegalievirus (CMV)-Promoters exprimiert	BioFocus DPI, Leiden, Niederlande
Adenoviraler Vektor, der die cDNA von grün fluoreszierendem Protein (GFP) unter der Kontrolle eines Zytomegalievirus (CMV)-Promoters exprimiert	BioFocus DPI

Tabelle 3: verwendete adenovirale Vektoren

48 Stunden nach dem Wechsel auf Differenzierungsmedium, also 72 Stunden nach dem Aussähen der Zellen, erfolgte die Transduktion der Zellen mit adenoviralen Vektoren, die die cDNA des Alpha-Synuklein-Wildtyps unter der Kontrolle eines CMV-Promoters überexprimierten (Tabelle 3). Dazu wurden aus jedem Well 50 µl abpipettiert und anschließend 50 µl einer zuvor vorbereiteten Lösung an Differenzierungsmedium inklusive der Viren hinzugefügt. Alle Arbeiten mit diesen Viren wurden in einem Labor der biologischen Sicherheitsstufe S2 durchgeführt. Für alle Experimente wurde eine MOI (Englisch: multiplicity of infection, auf Deutsch: Multiplizität der Infektion) von 5 verwendet. Das heißt, bei einer Zelldichte von 60.000 Zellen pro Well waren in der vorbereiteten Lösung 300.000 Viruspartikel in 50 µl Differenzierungsmedium gelöst und wurden in das Well pipettiert. Die MOI von 5 wurde gewählt, da sich diese in diesem Zellmodell als bester Kompromiss zwischen der Transduktionseffektivität und einer geringen prozeduralen Toxizität herausgestellt hatte (Höllerhage, Goebel et al., 2014): Bei einer MOI von 5 betrug die Transduktionsrate für Adenoviren, die den Alpha-Synuklein-Wildtyp exprimierten, 72,9 +/- 1,3 % (Höllerhage, Goebel et al., 2014). Als Kontrollen wurden je nach Experiment Leerkontrollen benutzt; bei diesen wurde ebenfalls 50 µl an Medium abpipettiert und anschließend wieder 50 µl frisches Differenzierungsmedium hinzugefügt. Bei anderen Experimenten bestanden die Kontrollwells aus Zellen, die mit einem adenoviralen Vektor transduziert wurden, der die cDNA von GFP unter der Kontrolle eines CMV-Promoters exprimierte. Die Transduktion erfolgte dabei entsprechend der Transduktion der adenoviralen Vektoren, die den Alpha-Synuklein-Wildtyp exprimierten. Die Transduktionsrate der Viren, die die cDNA von GFP enthielten, lag mit 83,7 +/- 0,7 % etwas höher (Höllerhage, Goebel et al., 2014).

24 Stunden nach der Transduktion wurden alle Wells – auch die Leerkontrollen – dreimal mit PBS gewaschen, um möglichst alle noch frei im Medium vorliegenden Viren aus dem Medium zu entfernen. In Western-Blot-Analysen zeigten Zellen sechs Tage nach der Transduktion von

adenoviralen Vektoren, die die cDNA des Alpha-Synuklein-Wildtyps enthielten, einen 4,3 +/- 0,6-fachen Anstieg der Alpha-Synuklein-Level im Vergleich zu nicht-transduzierten Zellen ($p < 0,01$) (Höllerhage, Goebel et al., 2014).

Die Toxizität wurde mittels der Laktatdehydrogenase-Freisetzung ins Zellkulturmedium gemessen (Erläuterung siehe unten). Dabei ergab sich vier Tage nach der Transduktion noch keine signifikante Toxizität durch die Überexpression vom Alpha-Synuklein-Wildtyp (9,4 +/- 0,7 % Toxizität) oder durch die Überexpression von GFP (3,7 +/- 0,4 % Toxizität) im Vergleich zu nicht-transduzierten Zellen (2,5 +/- 0,4 Toxizität). Sechs Tage nach der Virustransduktion zeigte sich dagegen eine eindeutig signifikante Toxizität durch die Überexpression vom Alpha-Synuklein-Wildtyp (55,8 +/- 2,2 % Toxizität, $p < 0,001$) im Vergleich sowohl zu GFP-transduzierten Zellen (11,5 +/- 0,7 % Toxizität) als auch zu nicht-transduzierten Zellen (5,9 +/- 0,4 % Toxizität) (Höllerhage, Goebel et al., 2014).

2.2 Material und Methoden zur Beeinflussung der Toxizität im Zellkulturmodell

2.2.1 Trifluoperazin

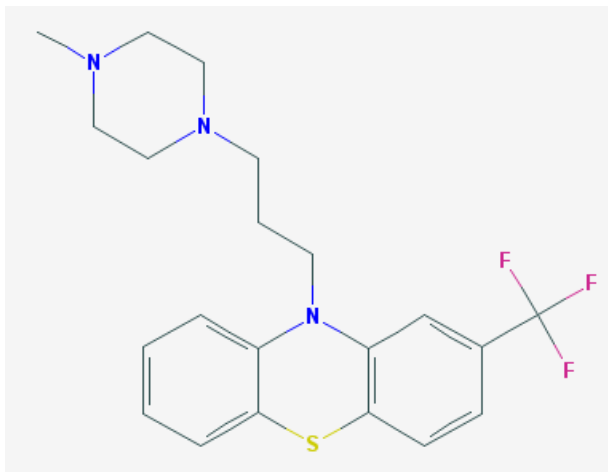


Abbildung 6: Strukturformel von Trifluoperazin (National Center for Biotechnology Information)

Trifluoperazin ist ein Phenothiazin-Derivat mit dem IUPAC-Namen 10-[3-(4-Methyl-1-Piperazinyl)-Propyl]-2-Trifluoromethyl-Phenothiazin (Abbildung 6). In der vorliegenden Dissertation wurde Trifluoperazin als Substanz getestet, da es in einer Studie als potenter Aktivator der Autophagie identifiziert wurde (Zhang et al., 2007). In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass Trifluoperazin insbesondere

in Neuronen ein potenter Induktor der Autophagie ist (Tsvetkov et al., 2010). Bekannt ist Trifluoperazin, da es ein seit langem in Gebrauch befindliches, typisches, hochpotentes Neuroleptikum ist (Koch et al., 2014). Bereits seit den 1960er Jahren gilt es als sicher und effektiv in der Behandlung der Schizophrenie und wird als ein Neuroleptikum der ersten Wahl im Rahmen einer akuten Phase der Schizophrenie angesehen (Marques et al., 2004; Reardon

et al., 1989). Sowohl für die Wirksamkeit als auch für die Nebenwirkungen ist – wie bei allen typischen Neuroleptika – überwiegend die Blockade des Dopamin-2-Rezeptors im Gehirn verantwortlich (Marques et al., 2004). Als wichtige Nebenwirkung im Zusammenhang mit dieser Dissertation sind insbesondere extrapyramidal-motorische Störungen zu nennen. Zu den extrapyramidal-motorischen Störungen gehören unter anderem Frühdyskinesien, ein medikamentös-induziertes Parkinson-Syndrom und Spätdyskinesien (Marques et al., 2004).

2.2.2 Behandlung der Zellen

2.2.2.1 Auflösen von Trifluoperazin und Erstellen von Stammlösungen

Trifluoperazin-Dihydrochlorid-Pulver (Sigma-Aldrich) wurde in steril gefiltertem, destilliertem Wasser gelöst und eine Stammlösung mit einer Konzentration von 10 mM erstellt. Die Lösung wurde anschließend gefiltert, aliquotiert und die Aliquots bei -20 °C aufbewahrt.

2.2.2.2 Behandlung der Zellen mit Trifluoperazin

Im Anschluss an den Waschvorgang 24 Stunden nach der Transduktion zur Entfernung freier extrazellulärer Viren, wurde die Behandlung der Zellen mit Trifluoperazin durchgeführt. Die Zellen wurden mit Trifluoperazin in Konzentrationen von 2 μ M, 4 μ M und 8 μ M behandelt. Diese Konzentrationen waren zuvor durch Vorversuche ermittelt worden. Dabei wurden die Konzentrationen gewählt, die nach mehreren Tagen keine morphologischen Veränderungen im Vergleich zu nicht-behandelten Zellen auslösten, also selbst nicht toxisch waren.

Zur Behandlung wurde Trifluoperazin in Differenzierungsmedium aufgelöst. Dafür wurden zunächst Lösungen mit 25 μ M, 50 μ M und 100 μ M erstellt. Danach wurden jeweils 24 μ l der 300 μ l Medium in den Zellkulturwells durch die jeweilige Trifluoperazin-Lösung ersetzt, sodass finale Konzentrationen von 2 μ M, 4 μ M oder 8 μ M im Zellkulturwell entstanden.

2.3 Material und Methoden zur Auswertung der Experimente

2.3.1 Auswertung der Zytotoxizität

Die Toxizität wurde sechs Tage nach der Transduktion ausgewertet (siehe auch Abbildung 5). Dazu wurde ein biochemischer Assay verwendet, der die Laktatdehydrogenase (LDH), ein intrazelluläres Enzym, indirekt misst. Zudem wurden vitale Zellen und apoptotische Zellen mikroskopisch quantifiziert.

2.3.1.1 LDH-Assay

Die LDH-Konzentration im Medium korreliert invers mit der Zellmembranintegrität. Eine hohe LDH-Konzentration im Medium spiegelt deswegen einen hohen Anteil an geschädigten bzw. abgestorbenen Zellen wider. Die Messung der LDH-Konzentration ist ein anerkanntes Standardverfahren zur Messung der Zelltoxizität (Decker and Lohmann-Matthes, 1988; Hsiao et al., 2013; Korzeniewski and Callewaert, 1983). In dem hier verwendeten kommerziellen Testverfahren (CytoTox-ONE Homogeneous Membrane Integrity Assay, Promega, Fitchburg, WI, USA) wird die LDH-Konzentration durch die Zugabe der Substrate Laktat, NAD^+ und Resazurin sowie Zugabe des Enzyms Diaphorase gemessen. Die LDH oxidiert Laktat zu Pyruvat mit Hilfe von NAD^+ , welches bei dieser Reaktion zu NADH reduziert wird. Diaphorase wiederum benutzt NADH als Reduktionsmittel, um Resazurin in fluoreszierendes Resofurin zu reduzieren.

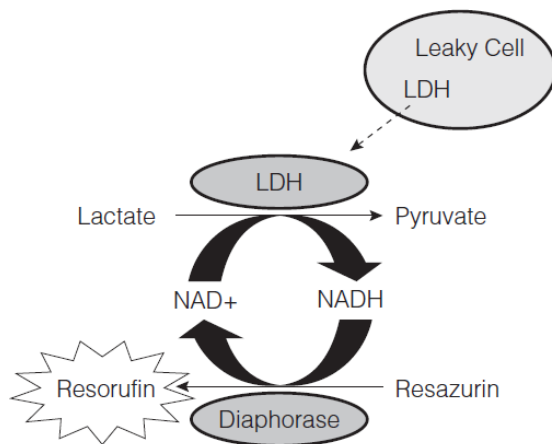


Abbildung 7: Die Freisetzung von LDH aus geschädigten Zellen mit Verlust der Zellmembranintegrität wird durch Hinzugabe von Laktat, NAD^+ , Resazurin und des Enzyms Diaphorase gemessen. Die Entstehung des fluoreszierenden Resofurin ist proportional zur LDH-Konzentration (aus „Technical Bulletin“ des „CytoTox-ONE™ Homogeneous Membrane Integrity Assay“)

Die Konzentration an Resofurin ist dementsprechend proportional zur Konzentration an LDH im Medium (Abbildung 7).

Die Messung erfolgte entsprechend der Herstellerangaben: Zur Vorbereitung wurden der Substrat-Mix und der Assay-Puffer auf Raumtemperatur erwärmt, da der Assay für 22 °C optimiert ist. 11 ml des Assay-Puffers wurden mit einem Fläschchen des Substrat-Gemisches gemischt, um das CytoTox-ONE Reagenz herzustellen. Bei jedem Versuch wurde eine Leerkontrolle nur mit Differenzierungsmedium

mitgemessen, um die Fluoreszenz des Differenzierungsmediums als Hintergrund-Fluoreszenz zu messen. Diese wurde anschließend von allen gemessenen Werten abgezogen. Weiterhin wurde bei jedem Experiment eine Negativkontrolle mit nicht-behandelten Zellen mitgemessen. Zudem wurde eine Positivkontrolle mit lysierten Zellen gemessen, um die maximal mögliche LDH-Freisetzung zu ermitteln. Für Positivkontrollen wurden 2 µl einer Lyse-Lösung (9%iges Triton X100 in Wasser) pro 100 µl an Differenzierungsmedium hinzugegeben, bei 300 µl Differenzierungsmedium pro Well also 6 µl Lyse-Lösung pro Well. Anschließend

wurde die Lyse-Lösung für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Von jedem Well wurden dann 75 µl des Mediums mit einer Multikanal-Pipette in Wells einer schwarzen 96-Well-Platte pipettiert. Es wurde dann ein äquivalentes Volumen des zuvor gemixten CytoTox-ONE Reagenz in jedes Well pipettiert und die Platte für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 10 Minuten wurde in jedes Well 37,5 µl der Stopp-Lösung pipettiert, um die chemische Reaktion zu stoppen und somit eine bessere Konsistenz der Ergebnisse zu erreichen. Es wurde darauf geachtet, die Stopp-Lösung in derselben Reihenfolge wie das Pipettieren des Reagenz durchzuführen. Nach Zugabe der Stopp-Lösung wurde die Fluoreszenz mit Hilfe des FLUOstar Omega Fluoreszenz-Readers (BMG Labtech, Ortenberg, Deutschland) gemessen, die Anregungswellenlänge betrug 560 nm und die Emissionswellenlänge 590 nm.

Der Mittelwert der Hintergrundfluoreszenz, also die Fluoreszenz des Differenzierungsmediums, wurde von allen Messergebnissen abgezogen. Die absolute Zytotoxizität ergibt sich aus der folgenden Formel:

$$\text{absolute Zytotoxizität (in \%)} = 100 * \frac{(\text{Messergebnis Experiment} - \text{Hintergrundfluoreszenz})}{(\text{Mittelwert Positivkontrollen} - \text{Hintergrundfluoreszenz})}$$

Meist wurde aber die relative Zytotoxizität berechnet in Relation zum Mittelwert der Fluoreszenz der Alpha-Synuklein-überexprimierenden Zellen:

$$\text{relative Zytotoxizität (in \%)} = 100 * \frac{(\text{Messergebnis Experiment} - \text{Hintergrundfluoreszenz})}{(\text{Mittelwert alpha-Synuklein-Zellen} - \text{Hintergrundfluoreszenz})}$$

Um auszuschließen, dass die verwendeten Einzelsubstanzen mit dem Testverfahren interagieren, wurde Medium von lysierten Zellen (Positivkontrollen) verwendet. In dieses Medium wurden jeweils Trifluoperazin und Chloroquin in den auch für die Experimente verwendeten Konzentrationen hinzugegeben und die Fluoreszenz wie oben beschrieben gemessen. Dabei zeigte sich für keine der verwendeten Substanzen eine signifikante Beeinflussung der Fluoreszenz im Vergleich zum reinen Medium.

2.3.1.2 Quantifizierung vitaler und apoptotischer Zellen

2.3.1.2.1 Fixierung der Zellen

Die Zellen wurden am Tag der Auswertung, also sechs Tage nach der Virus-Transduktion, mittels Paraformaldehyd (PFA, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) fixiert. Dazu wurde im Anschluss an die Entnahme von 75 µl Medium für den LDH-Assay pro Well 27 µl 37%iges PFA auf die restlichen 225 µl Medium pipettiert, um eine PFA-Konzentration von 4 % zu erreichen, und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde jedes Well dreimal mit

PBS gewaschen und zum Schluss 300 µl PBS in die Wells gefüllt. Bis zur Weiterverarbeitung wurden die Platten bei 4 °C aufbewahrt.

2.3.1.2.2 Färbung der Zellkerne

Die Färbung der Zellkerne erfolgte, um die Zellen anschließend quantifizieren zu können. Die Kernfärbung wurde mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI, Sigma-Aldrich) durchgeführt. DAPI lagert sich bevorzugt in Bereiche der doppelsträngigen Desoxyribonukleinsäure (DNA) mit einem hohen Anteil an Adenin-Thymin-Basenpaaren an und zwar insbesondere in die kleine Furche der DNA (Tanious et al., 1992). Nach Anregung mit ultraviolettem Licht emittiert DAPI Licht im sichtbaren blauen Bereich.

Zunächst wurde 1 mg DAPI in 1 ml steril gefiltertem, destilliertem Wasser aufgelöst und anschließend filtriert, um etwaige DAPI-Aggregate, die die Färbequalität beeinflussen könnten, zu entfernen. Für die Färbung wurde diese Lösung 1:1.000 in einer Lösung aus PBS inklusive 0,15 % Triton X100 (Merck Millipore) verdünnt. Triton X diente dazu die Zellmembran porös zu machen und den Eintritt von DAPI zu erleichtern. In jedes Well wurden nach Entfernung des in den Wells befindlichen PBS 250 µl dieser Lösung pipettiert und für 15 Minuten auf einem Zellkulturplattenschüttler inkubiert. Anschließend wurden die Wells fünfmal mit PBS gewaschen.

2.3.1.2.3 Erstellung von Aufnahmen

Um die Zellen anschließend quantifizieren zu können, wurden mit einem konfokalen Mikroskop (SP 5, Leica Microsystems) schematisch – immer linker Wellrand, rechter Wellrand, oberer Wellrand, unterer Wellrand und mittig – 5 Bildausschnitte pro Well aufgenommen. Dazu wurde die Leica Application Suite als Software verwendet; die Vergrößerung am Objektiv betrug 20-fach, was zusammen mit der Vergrößerung am Okular (10-fach) eine 200-fache Vergrößerung ergibt. Pro Bedingung wurden Bildausschnitte aus mindestens 12 Wells von mindestens 3 biologischen Replikaten aufgenommen, so dass pro Bedingung mindestens 60 Bildausschnitte ausgezählt wurden.

2.3.1.2.4 Verblindung

Um während des Auszählens eine Verblindung gegenüber den unterschiedlichen Bedingungen zu erreichen, wurde die Software Ant Renamer (Version 2.10.0; Antoine Potten, Brüssel, Belgien) verwendet. Mit Hilfe der Software wurden die Bilddateien vor Zählung der Zellen in

zufällig generierte Dateinamen umbenannt. Nach Zählung der Zellen anhand der Bilder erfolgte mit Hilfe einer von der Software erstellten Tabelle eine Rückbenennung der Dateinamen, damit eine Zuordnung der Zellzahlen zu den jeweiligen Bedingungen erfolgen konnte.

2.3.1.2.5 Auszählen der Zellen

Die Anzahl der vitalen Zellen wurde anhand der Kernmorphologie der mittels DAPI gefärbten Zellkerne bestimmt; zur Auszählung wurde das Zellzähler Plug-in der Software ImageJ (Version 1.45p, Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA) verwendet. Dabei wurden ovale homogene Kerne als vital gewertet. Während – entsprechend den Empfehlungen des Nomenklatur-Komitees zum Zelltod – abgerundete Zellkerne, pyknotische Zellkerne, also schrumpfende Zellkerne, sowie die Kernfragmentierung zu sogenannten apoptotischen Körperchen als apoptotische Zellen gewertet wurden (Kroemer et al., 2009). Dabei muss aber beachtet werden, dass der Begriff „Apoptose“ hier nicht als Synonym für den sogenannten programmierten Zelltod mit Aktivierung von Caspasen gesehen werden darf, sondern nur eine Art des Zelltods mit spezifischen morphologischen Eigenschaften, wie er von Kerr und Kollegen 1972 geprägt wurde, beschreibt (Kerr et al., 1972; Kroemer et al., 2009). Bei der Zellzählung wurden jeweils drei biologische Replikate verwendet und insgesamt pro Bedingung mindestens 3500 Zellen ausgezählt.

2.3.2 Western Blot

Western Blot ist ein Verfahren zum spezifischen Nachweis von Proteinen mit Hilfe von markierten Antikörpern. Nach Auftrennung der Proteine durch eine Gelelektrophorese, werden sie durch das Blotting auf eine Membran übertragen, dann durch einen primären Antikörper gebunden, welcher wiederum durch einen sekundären, enzymgekoppelten Antikörper detektiert werden kann. In der vorliegenden Arbeit wurde Western Blot als Verfahren verwendet, um Veränderungen des Alpha-Synuklein-Proteins zu entdecken sowie zum Nachweis der Autophagie (s.u.). Die genaue Durchführung wird im Folgenden erläutert.

2.3.2.1 Extraktion der Proteine

Zunächst wurden die Proteine für die Durchführung der Western Blots gesammelt. Dazu wurde das restliche Medium – in aller Regel wurde zuvor ein LDH-Assay durchgeführt – entfernt. Anschließend wurden die Wells einmal mit PBS gewaschen. Um die Zellen zu lysieren und

somit die Proteine sammeln zu können, wurden danach 40 µl eines Reagenz zur Extraktion von Proteinen aus Säugetier-Zellen (M-PER, für Englisch: Mammalian Protein Extraction Reagent, Thermo Scientific Pierce Protein Research Products, Rockford, IL, USA) in jedes Well pipettiert. M-PER ist ein kommerzielles Produkt, welches die Zellmembran auflöst und lösliche zelluläre Proteine extrahiert. Nach einer Inkubationszeit von 5 Minuten wurden etwaige am Wellboden haftende Bestandteile mit einer Pipettenspitze vorsichtig abgeschabt. Es wurde so der Inhalt von vier Wells einer 48-Well-Platte mit identischen experimentellen Bedingungen zusammen in einem Eppendorf-Gefäß auf Eis gesammelt. Bis zur Durchführung des Western Blots wurden die Zell-Lysate bei -20 °C gelagert.

2.3.2.2 Messung der Proteinkonzentration

Vor Durchführung des Western Blots wurden die Zell-Lysate aufgetaut und mit 13.000 x g für 15 Minuten bei 4 °C zentrifugiert, um die unlöslichen Zellbestandteile von den löslichen Proteinen trennen zu können. Der gesamte flüssige Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß pipettiert.

Die Messung der Proteinkonzentrationen erfolgte mit Hilfe des Coomassie Plus (Bradford) Protein Assay Kits (Thermo Scientific Pierce Protein Research Products) entsprechend den Anweisungen des Herstellers. Vorbereitend wurde der mitgelieferte Proteinstandard aus Albumin zu verschiedenen Konzentrationen mit M-PER gemischt, um eine Proteinstandardreihe mit den Konzentrationen 2000 µg/ml, 1500 µg/ml, 1000 µg/ml, 750 µg/ml, 500 µg/ml, 250 µg/ml, 125 µg/ml, 25 µg/ml und 0 µg/ml zu erhalten.

Von jeder Probe mit unbekannter Proteinkonzentration und jedem Proteinstandard wurden dann 10 µl pro Well auf eine 96-Well-Mikroplatte (Greiner Bio One, Frickenhausen, Deutschland) pipettiert. Jede Probe wurde in jeweils zwei Wells pipettiert, um durch die Bildung eines Mittelwertes etwaige Ungenauigkeiten beim Pipettiervorgang abzumildern. Anschließend wurden in jedes Well mit einer Multikanal-Pipette 300 µl des Coomassie-Plus-Reagenz pipettiert und die Platte 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Mit dem FLUOstar Omega wurde dann die Absorption bei 595 nm gemessen. Die gemessene Absorption des Proteinstandards von 0 µg/ml, also der Leerkontrolle mit reinem M-PER, wurde von allen restlichen Ergebnissen subtrahiert. Mit Hilfe der MARS-Datenanalyse-Software (BMG Labtech) wurde eine Standardkurve aus der Proteinstandardreihe erstellt und anhand dieser die Proteinkonzentrationen der zu untersuchenden Proben ermittelt.

2.3.2.3 Herstellung eines Gels für die Gelelektrophorese

Rotiphorese Gel 30 (37,5:1)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tris(hydroxymethyl)aminomethanhydrochlorid (TRIS-Hydrochlorid)	Carl Roth
Natriumdodecylsulfat (SDS, engl.: sodium dodecyl sulfate)	Carl Roth
Ammoniumpersulfat (APS)	Carl Roth
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Carl Roth

Tabelle 4: Materialien zur Herstellung von Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelen

Für die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE, für Englisch: sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) wurden zunächst Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gele gegossen (Tabelle 4). Der Molekular-Siebeffekt der porösen Polyacrylamid-Matrix trennt SDS-Proteinkomplexe entsprechend ihrer Länge und des Radius auf. Aufgrund der Denaturierung der SDS-Proteinkomplexe sind Länge und Radius stark anhängig vom Molekulargewicht, sodass näherungsweise von einer Auftrennung der SDS-Proteinkomplexe entsprechend des Molekulargewichts ausgegangen werden kann. Es wurde hier die gängigere, sogenannte diskontinuierliche Gelelektrophorese eingesetzt, das heißt es wurden ein Trenn- und ein Sammelgel mit unterschiedlichem pH-Wert gegossen, was für eine höhere Bandenschärfe sorgt. Zum Gießen der Gele wurde eine 30 % Acrylamid-Bisacrylamid-Mischung (Rotiphorese Gel 30) im Mischungsverhältnis 37,5:1, verwendet. Für alle Western Blots wurden Gele mit 12 % Acrylamid entsprechend der Herstellerinformation hergestellt: In der Regel wurden zwei Gele parallel gegossen; dazu wurden für die Trenngele 6,6 ml destilliertes Wasser, 8 ml der Rotiphorese-Gel-30-Lösung und 5 ml TRIS-Hydrochlorid (1,5 M, pH 8,8; 18,17 g TRIS-Hydrochlorid auf 100 ml steril gefiltertes, destilliertes Wasser) gemischt. Anschließend wurden in folgender Reihenfolge hinzugegeben: 200 µl 10%ige SDS-Lösung, 200 µl 10%ige APS-Lösung und 20 µl TEMED. Der Ansatz wurde dann in eine Gelkammer gegossen und zur Glättung der Gele mit Isopropanol (Merck Millipore) überschichtet. Nach einer Inkubationszeit von etwa 30 Minuten, um die Polymerisation des Trenngels abzuwarten, wurde das Isopropanol entfernt. Dann wurden – wiederum entsprechend der Herstellerinformationen – die Sammelgele gegossen: Es wurden 5,5 ml steril gefiltertes, destilliertes Wasser, 1,7 ml der Rotiphorese Gel 30-Lösung, 1 ml TRIS-Hydrochlorid (1 M, pH 6,8; 12,11 g TRIS-Hydrochlorid auf 100 ml steril gefiltertes, destilliertes Wasser), 80 µl 10%ige SDS-Lösung, 80 µl 10%ige APS-Lösung und 8 µl TEMED gemischt. Nach der Hinzugabe von

TEMED wurden die Sammelgele sofort auf die Trenngele gegossen und der Kamm für die Probenfächer eingesetzt.

2.3.2.4 Beladung der Gele mit den Proteinproben

Je nach zuvor gemessener Proteinkonzentration der Proben, wurde ein Volumen der Proben mit steril gefiltertem, destilliertem Wasser verdünnt, sodass sich in 22,5 µl 15 µg an Protein befanden. Zu diesen 22,5 µl wurden 7,5 µl des 4-fach konzentrierten, reduzierenden Laufpuffers (Roti-Load 1, Carl Roth) pipettiert. Dieser enthält unter anderem SDS und 2-Mercapto-Ethanol. SDS besteht aus einem negativen und aus einem hydrophoben Anteil. Mit dem hydrophoben Bereich bindet SDS an hydrophobe Bereiche der Proteine. Der negative Anteil des SDS ist nach außen gerichtet, wodurch die Abstoßungsreaktionen benachbarter negativ geladener Gruppen die SDS-Proteinkomplexe in eine annähernd lineare Konformation überführen. Zudem überdeckt das negativ geladene SDS die Eigenladung der Proteine und sorgt dafür, dass alle Proteine ähnlich stark negativ geladen sind und bei Anlegen einer Spannung in einer Geschwindigkeit entsprechend ihrer Größe zur Anode wandern. 2-Mercaptoethanol sorgt für reduzierende Bedingungen und kann somit insbesondere Disulfid-Verbindungen auflösen, die zur Tertiärstruktur und Quartärstruktur von Proteinen beitragen. Die vorbereiteten Proben inklusive des Laufpuffers wurden im Wasserbad für 5 Minuten auf 100 °C erhitzt, um etwaige Proteasen zu inaktivieren und noch vorhandene Tertiärstrukturen zu durchbrechen. Dann wurden 20 µl der 30 µl Probenlösung nach gutem Durchmischen in die Probenfächer pipettiert, sodass sich letztendlich 10 µg an Protein in jeder Probenfächer befanden. Zusätzlich wurde in eine Probenfächer 5 µl einer Proteinleiter (PageRuler Prestained Protein Ladder, 10 to 170 kDa, Thermo Scientific) als Größenmarker pipettiert.

2.3.2.5 Gelelektrophorese und Proteintransfer

Die Auftrennung der Proteine durch die SDS-PAGE erfolgte im Rotiporese-10x-SDS-PAGE-Laufpuffer (Carl Roth), der zuvor mittels steril gefiltertem, destilliertem Wasser auf 1-fach konzentriert verdünnt wurde, bei 150 V in der Western Blot-Kammer Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Die Elektrophorese wurde beendet, sobald die Lauffront knapp oberhalb des Gelendes angekommen war, dies war in der Regel nach etwa 90 Minuten der Fall. Für das anschließende Blotting wurde in der Zwischenzeit Transferpuffer vorbereitet: 3,03 g Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS, Sigma-Aldrich), 14,4 g Glycin (Carl Roth) und 200 ml Methanol (Sigma-Aldrich) wurden gemischt und mittels steril gefiltertem, destilliertem Wasser

auf eine Gesamtmenge von 1 l aufgefüllt. Die im Gel aufgetrennten Proteine wurden in der Western-Blot-Kammer mit 25 V über 120 Minuten bei 4 °C durch Blotten in dem Transferpuffer auf eine Nitrozellulosemembran (Nitrocellulose/Filter Paper Sandwich, 0.45 µm pore size, LifeTechnologies) transferiert. Anschließend wurde die Nitrozellulosemembran zweimal mit PBS gewaschen.

2.3.2.6 Inkubation der Nitrozellulosemembran mit dem primären und sekundären Antikörpern

Anschließend wurde die Nitrozellulosemembran für 90 Minuten in Roti-Block (10x Konzentrat, Carl Roth), welches zuvor mit steril gefiltertem, destilliertem Wasser auf 1-fach konzentriert verdünnt wurde, inkubiert. Dieser Schritt wurde durchgeführt, um die unspezifischen Bindungsstellen der auf der Membran befindlichen Proteine zu blockieren. Es folgte die Inkubation des jeweiligen Primärantikörpers über Nacht in 12 ml Roti-Block. Die Primärantikörper wurden in folgenden Konzentrationen verwendet: α-synuclein-(C-20)-R-Antikörper (sc-7011-R, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA): 1:1500; anti-Synuclein α Antikörper (Merck Millipore): 1:2000; LC3B-Antikörper (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA): 1:1000. Danach wurde die Nitrozellulosemembran zweimal mit PBS gespült und dreimal für 10 Minuten mit PBS inklusive 0,1 % Tween 20 (Sigma-Aldrich) gewaschen, um die nicht-gebundenen Primär-Antikörper zu entfernen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit einem mit Meerrettichperoxidase (HRP, für Englisch: horseradish peroxidase) konjugierten Sekundär-Antikörper (Goat anti-rabbit IgG-HRP, Santa Cruz Biotechnology) in einer Konzentration von 1:3000 in 12 ml Roti-Block. Bei allen Western Blots konnte als Sekundär-Antikörper ein gegen Kaninchen-Antikörper gerichteter Antikörper verwendet werden, da alle drei benutzten Primär-Antikörper in Kaninchen produziert wurden. Dieser Sekundär-Antikörper band an die Primär-Antikörper, die spezifisch ihr jeweiliges Zielprotein – sofern vorhanden – auf der Membran erfasst hatten. Die Kopplung des Sekundär-Antikörper mit HRP ermöglichte die unten beschriebene Detektion mit einem ECL (für Englisch: enhanced chemiluminescence) Peroxidase-Substrat (Pierce ECL Western Blotting Substrate, Thermo Scientific, Pierce Protein Biology Products).

2.3.2.7 Entwicklung der Western-Blot-Filme

Die Nitrozellulosemembran wurde nach der Inkubation mit dem Sekundär-Antikörper erneut zweimal kurz und dreimal für 10 Minuten mit PBS inklusive 0,1 % Tween 20 gewaschen.

Anschließend wurde die Nitrozellulosemembran für 3 Minuten in reinem PBS gewaschen und in der Zwischenzeit die Arbeitslösung des ECL-Peroxidase-Substrats vorbereitet, indem 4 ml des Reagenz 1 mit 4 ml des Reagenz 2 gemischt wurden. Die Membran wurde dann bei Raumtemperatur für 1 Minute unter Schwenken in den 8 ml der Arbeitslösung des ECL-Peroxidase-Substrats inkubiert. Die Arbeitslösung des ECL-Peroxidase-Substrats enthält Luminol, welches durch die HRP oxidiert wird. Das entstandene Produkt luminesziert, da es sich in einem angeregten Zustand befindet (Chemilumineszenz): Es wird über mehrere Zwischenschritte in den Grundzustand überführt und emittiert dabei Licht im bläulichen Bereich. Dieses Licht wurde dazu benutzt einen Autoradiographiefilm (Carestream Kodak BioMax light film, Sigma-Aldrich) in einer Röntgenfilmkassette (DuPont Cronex Intensifying Screens Quanta Detail, DuPont, Wilmington, Delaware, USA) zu belichten. Die Belichtungszeit lag zwischen wenigen Sekunden für die Alpha-Synuklein-Monomere und mehreren Minuten für Alpha-Synuklein-Banden mit höherem Molekulargewicht.

2.3.2.8 Kontrolle der Proteinbeladung mittels Aktinkontrolle

Um zu zeigen, dass bei allen Proben eines Western Blots eine vergleichbare Menge an Proteinen analysiert wurde, wurde die Nitrozellulosemembran anschließend für 1 Stunde mit einem direkt mit HRP konjugierten Aktin-Antikörper (Santa Cruz Biotechnology) mit einer Konzentration von 1:3000 in 1-fach verdünntem Roti-Block inkubiert. Anschließend wurde die Membran wie oben beschrieben gewaschen und es erfolgte die Filmentwicklung wie oben dargelegt.

2.3.2.9 Digitalisierung und Quantifizierung der Western-Blot-Banden

Alle Filme wurden mit Hilfe des Flachbett-Scanners Epson V33 (Seiko Epson Corporation, Suwa, Japan) und der zugehörigen Software digitalisiert. Bei den Einstellungen wurden dabei „16-Bit-Graustufen“ als Bildtyp und eine Punktdichte von 2400 dpi gewählt. Die Banden wurden mit der Software ImageJ (Wayne Rasband, National Institutes of Health, Bethesda, USA) wie folgt quantifiziert: Zunächst wurden die geladenen Bilder der Western Blots invertiert. Dann wurde um die jeweilige Bande ein Rechteck gezogen, welches die gesamte Bande einschloss. Mit Hilfe der Software wurde dann die gesamte integrierte Dichte in diesem Rechteck („integrated density“) gemessen. Anschließend wurde der Hintergrund gemessen, indem angrenzend zur quantifizierten Bande die integrierte Dichte eines gleichgroßen Rechtecks bestimmt wurde; dieser wurde dann von dem Wert der spezifischen Bande subtrahiert. Die Dichtewerte der

einzelnen Banden wurden summiert und anschließend der Dichtewert jeder einzelnen Bande durch die Summe aller Banden geteilt, um den relativen Anteil jeder einzelnen Bande zu erhalten. Genauso wurden die relativen Dichtewerte der jeweiligen Aktin-Banden bestimmt. Im Anschluss wurden die jeweiligen relativen Dichtewerte der einzelnen Banden des Zielproteins (Alpha-Synuklein oder LC3B-II) durch die zugehörigen Werte der Aktin-Banden dividiert um auf Aktin zu normalisieren. Die Normalisierung auf die Dichte der jeweiligen Aktin-Bande wurde durchgeführt, um etwaige Unterschiede der pipettierten Gesamtproteinmenge als Ursache für Dichteunterschiede einer spezifischen Bande unter den verschiedenen Bedingungen auszugleichen. Diese Art der Quantifizierung ermöglicht es, Western Blots unterschiedlich starker Exposition miteinander vergleichen zu können, ohne dass die Expositionszeit einen relevanten Einfluss auf das Ergebnis hat.

2.3.3 Messung der Autophagie

Das Standardverfahren zur Messung der Autophagie ist die Bestimmung der Konzentrationen des Autophagosom-assoziierten Proteins LC3B-II zum Beispiel mittels Western Blot (Winslow et al., 2010).

LC3 ist die gewöhnlich verwendete Abkürzung für die leichte Kette 3 des Mikrotubuli-assoziierten Proteins 1 (Barth et al., 2010). Nach der Translation wird LC3 in LC3-I prozessiert (Barth et al., 2010). Obwohl LC3-I per Western Blot detektiert werden kann, ist es als Marker der Autophagie unzuverlässig, da es in Zell-Lysate instabil und nicht direkt mit Autophagosomen assoziiert ist (Klionsky et al., 2012; Winslow et al., 2010). Bei Induktion der Autophagie wird durch verschiedene Enzyme das stark lipophile Phosphatidyl-Ethanolamin an LC3-I gebunden, wodurch LC3-II entsteht (Barth et al., 2010). Über Phosphatidyl-Ethanolamin wird LC3-II in die Membran von Phagophoren und Autophagosomen integriert (Barth et al., 2010). LC3-II ist bisher das einzige gut charakterisierte Protein, welches spezifisch an Strukturen der Autophagie lokalisiert ist (Barth et al., 2010; Klionsky et al., 2012). Es existieren drei Isoformen von LC3-II, LC3A-II, LC3B-II und LC3C-II (He et al., 2003). Nur LC3B-II korreliert mit erhöhten Konzentrationen an Autophagosomen, weshalb hier Antikörper gegen LC3B verwendet wurden (Barth et al., 2010). Die Menge an LC3B-II unter den verschiedenen Bedingungen wurde mittels Western Blot in der oben beschriebenen Art und Weise nachgewiesen. Wie empfohlen, wurde die Intensität der LC3B-II-Bande in Relation zur Aktin-Bande gesetzt (Barth et al., 2010; Klionsky et al., 2012).

Ein wichtiger Fakt bei der Interpretation dieser Ergebnisse ist, dass erhöhte Mengen an LC3B-II entsprechend einer erhöhten Autophagosomenkonzentration entweder auf eine erhöhte Autophagosomen-Entstehung, also eine verstärkte Autophagie, oder aber auf einen verminderten Abbau der Autophagosomen hindeuten können (Klionsky et al., 2012; Rubinsztein et al., 2009). Deswegen ist es wichtig eine Kontrolle dieser Ergebnisse an gleich behandelten Zellen durchzuführen, die zusätzlich mit einem Inhibitor des Autophagosomen-Abbaus behandelt wurden, um bewusst eine Akkumulation von Autophagosomen zu erreichen (Abbildung 8). Die Differenz der LC3B-II-Konzentration einmal ohne und einmal mit Inhibition des Autophagosomen-Abbaus ist dann ein Maß für die tatsächliche Autophagosomen-Entstehung und somit die Autophagie-Aktivität (Barth et al., 2010; Klionsky et al., 2012).

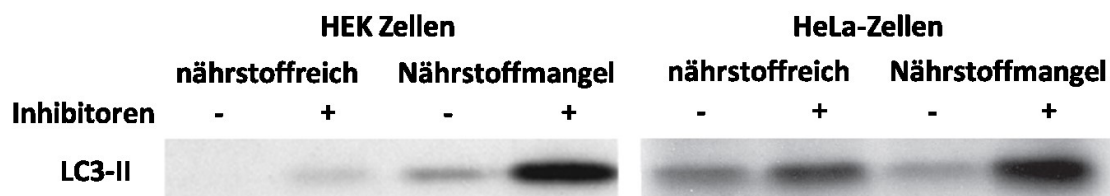


Abbildung 8 (modifiziert nach Klionsky et al., 2012): HEK-Zellen und HeLa-Zellen wurden entweder in nährstoffreichem oder unter Bedingungen eines Nährstoffmangels inkubiert. Nährstoffmangel ist ein bekannter unspezifischer Aktivator der Autophagie. Beides geschah jeweils in Abwesenheit (-) oder Anwesenheit (+) eines Autophagie-Inhibitors. Hier ist der entsprechende Western Blot mit LC3B-II-Antikörpern dargestellt. In der Abwesenheit eines Inhibitors resultiert der Nährstoffmangel in einer gemäßigten Intensivierung der Bandenstärke im Falle der HEK-Zellen – im Falle der HeLa-Zellen resultiert aber sogar eine Reduktion der Bandenstärke. Erst die Hinzugabe eines Inhibitors offenbart bei den HeLa-Zellen, dass unter Bedingungen eines Nährstoffmangels ein erhöhter Autophagosomen-Umsatz vorliegt und somit eine Aktivierung der Autophagie. Dies illustriert, dass die Messung und Interpretation der LC3B-II-Konzentration immer auch unter Hinzugabe eines Autophagie-Inhibitors erfolgen muss.

In dieser Dissertation wurde zur Hemmung des Autophagosomen-Abbaus Chloroquin (Sigma-Aldrich) verwendet – eine sehr häufig zu diesem Zweck verwendete Substanz (Cufí et al., 2013; Klionsky et al., 2012). Bekannt ist Chloroquin ansonsten als seit mehr als sechs Jahrzehnten eingesetztes Anti-Malaria-Medikament (Cufí et al., 2013; White et al., 2014). Chloroquin diffundiert in nicht-protonierter Form passiv ins Lysosom, wird dort protoniert und akkumuliert in protonierter Form im Lysosom (Lee and Tannock, 2006; Poole and Ohkuma, 1981). Als leicht alkalische Substanz neutralisiert Chloroquin den pH-Wert des normalerweise azidotischen Milieus der Lysosomen (Hubbi et al., 2013; Poole and Ohkuma, 1981). Der niedrige pH-Wert ist allerdings essentiell für die Funktion des Lysosoms. In der Folge der Alkalisierung durch Chloroquin werden die lysosomalen Proteasen inhibiert, aber auch die Fusion zwischen Autophagosomen und Lysosomen verhindert (Kawai et al., 2007; Klionsky et al., 2008). Als Folge akkumulieren die Autophagosomen und die Konzentration an LC3B-II steigt (Barth et al., 2010; Klionsky et al., 2012). Kommt es unter der Inhibition der Fusion von Autophagosomen und Lysosomen durch Chloroquin zu einer deutlich erhöhten Konzentration

an LC3B-II, so spricht dies für eine effiziente Autophagie unter den geprüften Bedingungen. Bleibt diese Erhöhung der LC3B-II-Konzentration unter Inhibition dagegen aus oder ist nur gering ausgeprägt, so spricht dies für eine ineffiziente Autophagie unter den geprüften Bedingungen (Klionsky et al., 2012; Rubinsztein et al., 2009).

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurde Chloroquin in Differenzierungsmedium aufgelöst und eine Stammlösung von 10 mM erstellt. Diese Stammlösung wurde aliquotiert und die Aliquots bei -20 °C aufbewahrt. Zunächst wurde die optimale Zeitdauer und Konzentration der Chloroquin-Behandlung in den LUHMES-Zellen in Vorversuchen ermittelt: Dabei zeigte sich die stärkste LC3B-II-Bande und damit die stärkste Autophagosomen-Akkumulation unter einer Behandlung mit 100 µM Chloroquin für 24 h, sodass in den anschließenden Experimenten die Autophagie-Blockade mit diesen Bedingungen durchgeführt wurde.

2.3.4 Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung wurde das Programm GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) und Microsoft Excel 2010 (Microsoft Corporation, Redmond, USA) verwendet. Zur Signifikanzanalyse zwischen den einzelnen experimentellen Bedingungen wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse (One-way ANOVA, von engl.: One way analysis of variance) durchgeführt, gefolgt von dem Tukey-Test als Post-hoc-Test. Einzig bei der Auswertung der LC3B-II-Bande in Western Blots wurde der Fisher-LSD-Test als Post-hoc-Test verwendet. Zur Korrelationsanalyse wurde der Korrelationskoeffizient nach Pearson berechnet. Die abgebildeten Graphiken im Ergebnisteil wurden mit Hilfe von GraphPad Prism 6.0 erstellt. In den Säulendiagrammen wird durch die Balken der jeweilige Standardfehler illustriert.

3 Ergebnisse

3.1 Aktivierung der Autophagie durch Trifluoperazin in LUHMES-Neuronen

Zunächst sollte demonstriert werden, dass Trifluoperazin, ein bekannter Aktivator der Autophagie in Neuronen, tatsächlich in den LUHMES-Neuronen die Autophagie aktiviert. Dabei wurde der gleiche zeitliche Ablauf wie später bei den Neuroprotektions-Experimenten eingehalten. Die Messung von LC3B-II mittels Western Blot wurde verwendet, um eine Aktivierung der Autophagie nachzuweisen (siehe auch „Material und Methoden“). Die Zellen wurden drei Tage in Differenzierungsmedium gehalten, bevor sie mit den Trifluoperazin-Konzentrationen 2 μ M, 4 μ M und 8 μ M behandelt wurden. Fünf Tage später wurden die Zell-Lysate zur Erstellung von Western Blots gesammelt. Die Western-Blot-Ergebnisse zeigen, dass es dosisabhängig unter Trifluoperazin zu einer Verstärkung der LC3B-II-Bande kommt. Dies bedeutet, dass die Anzahl der Autophagosomen zunimmt (Abbildung 9).

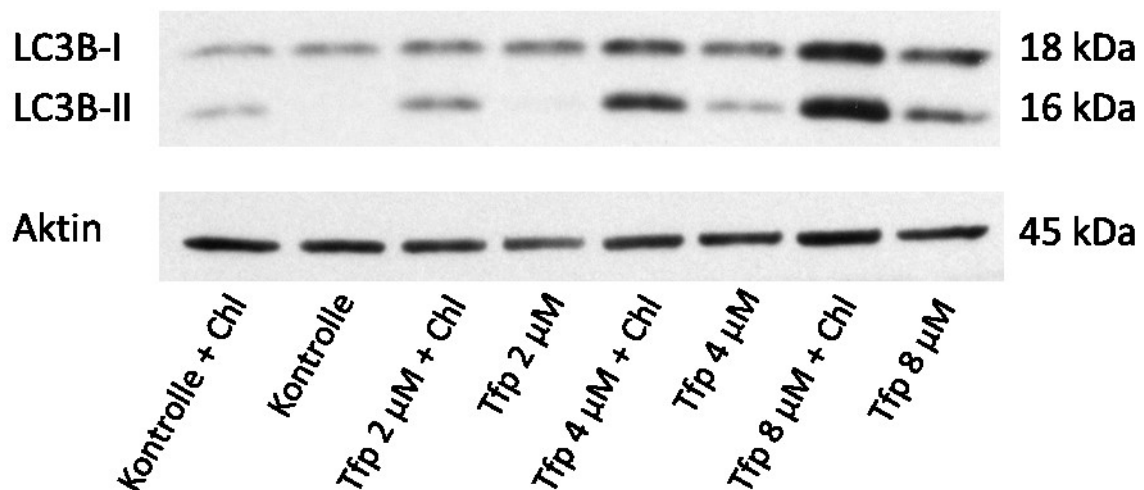


Abbildung 9: Trifluoperazin aktivierte Autophagie in LUHMES-Neuronen. Ein repräsentativer Western Blot demonstriert die dosisabhängige Zunahme von LC3B-II unter Behandlung mit Trifluoperazin (Tfp). Durch zusätzliche Behandlung der Zellen mit 100 μ M Chloroquin (Chl) über 24 Stunden verstärkte sich die entscheidende LC3B-II-Bande nochmals deutlich. Dies verdeutlicht tatsächlich eine Aktivierung des Autophagosomen-Umsatzes unter Trifluoperazin und somit eine Aktivierung der Autophagie. In der unteren Darstellung sind die jeweiligen Aktinkontrollen gezeigt.

Allerdings kann dies entweder durch eine verstärkte Bildung der Autophagosomen oder durch eine reduzierte lysosomale Degradation der Autophagosomen, also eine Hemmung der Autophagie, bedingt sein (siehe auch „Material und Methoden“). Um zu zeigen, dass tatsächlich eine Aktivierung der Autophagie mittels Trifluoperazin stattfand, wurde die Hälfte der Wells jeweils vier Tage nach Beginn der Trifluoperazin-Behandlung 24 Stunden mit 100 μ M Chloroquin behandelt. Dadurch wurde die Degradation der Autophagosomen gehemmt. Unter

Behandlung mit Chloroquin verstärkten sich die LC3B-II-Banden nochmals gegenüber einer alleinigen Trifluoperazin-Behandlung (Abbildung 9). Diese Ergebnisse zeigen, dass Trifluoperazin auch in LUHMES-Zellen die Autophagie aktiviert, und zwar dosisabhängig.

Zudem erfolgte auch die Quantifizierung von vier biologischen Replikaten dieser Demonstration der Autophagie-Aktivierung durch Trifluoperazin (Abbildung 10).

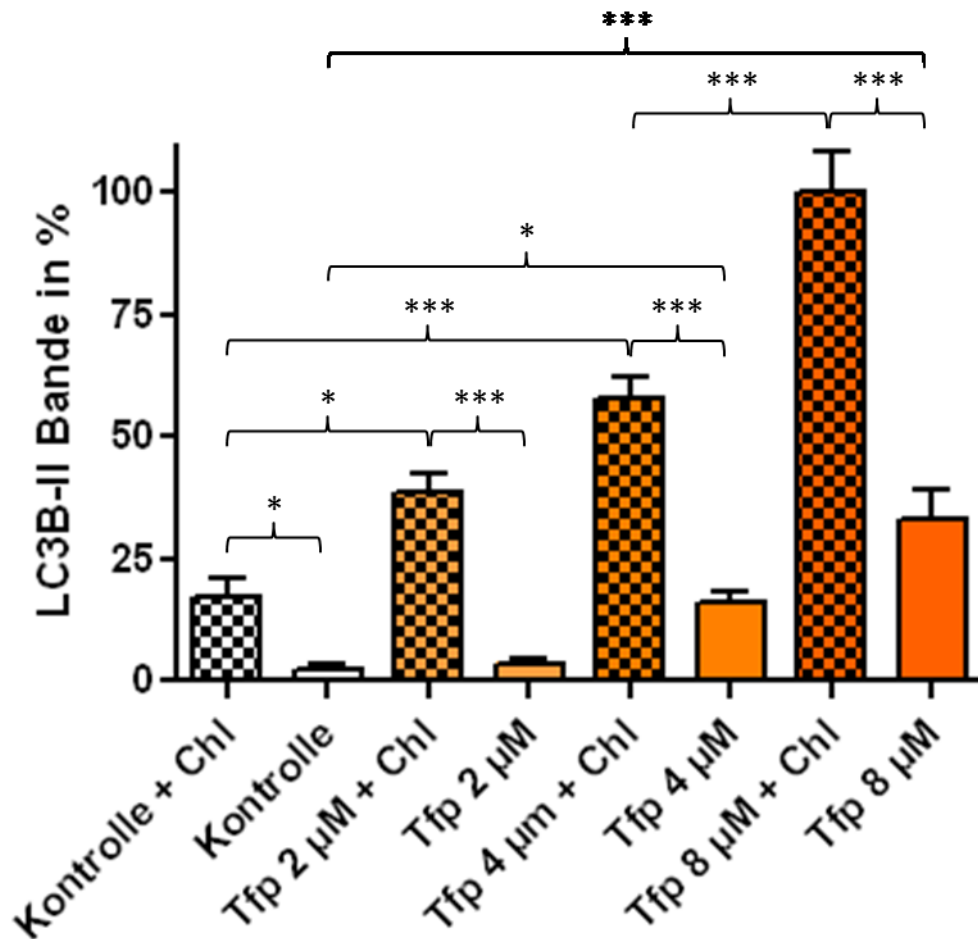


Abbildung 10: Quantifizierung der LC3B-II Bande aus Western Blots von vier biologischen Replikaten des in Abbildung 9 beschriebenen Experiments. Orange koloriert sind die Bedingungen unter Trifluoperazin (Tfp) in ansteigender Dosis. Kariert sind die Bedingungen unter der Einwirkung von 100 µM Chloroquin (Chl) für 24 h. Angegeben ist die auf Aktin normalisierte Bandenintensität in % (Tfp 8 µM + Chl = 100 %). Unter Trifluoperazin kam es zu einem Anstieg der LC3B-II-Bandenintensität, welche unter Chloroquin noch deutlich verstärkt wurde. Dies weist die Aktivierung der Autophagie durch Trifluoperazin in LUHMES-Zellen nach. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$

3.2 Protektion vor Alpha-Synuklein-Wildtyp-induzierter Toxizität durch Trifluoperazin

LUHMES-Zellen wurden mittels adenoviraler Vektoren transduziert, die den Alpha-Synuklein-Wildtyp überexprimierten. Einen Tag nach der Transduktion erfolgte die Behandlung der Zellen mit 2 μ M, 4 μ M und 8 μ M Trifluoperazin. Fünf Tage nach der Behandlung wurde die Auswertung durchgeführt. Dazu wurde zum einen die LDH-Konzentration als Maß der Toxizität gemessen. Zum anderen wurden die Zellen fixiert, die Zellkerne mit DAPI gefärbt und anschließend vitale Zellen sowie apoptotische Zellen ausgezählt.

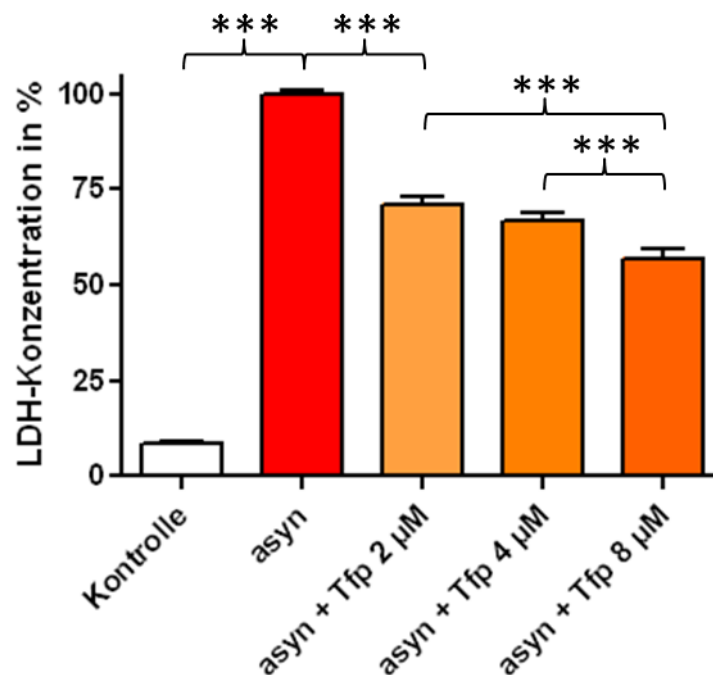


Abbildung 11: Dosisabhängige Reduktion der Toxizität mittels Trifluoperazin gemessen anhand der LDH-Konzentration im Zellkulturmedium. Die Graphik zeigt die LDH-Konzentrationen im Zellkulturmedium unter verschiedenen Bedingungen relativ zur LDH-Konzentration von Zellen, die mittels adenoviraler Transduktion den Alpha-Synuklein-Wildtyp (asyn) überexprimierten (asyn = 100 %). Die Behandlung dieser transduzierten Zellen durch Trifluoperazin (Tfp) führte dosisabhängig (2 μ M, 4 μ M und 8 μ M) zu einer Reduktion der LDH-Konzentration und somit zu einer Protektion vor der Alpha-Synuklein-Wildtyp-induzierten Toxizität. Zudem sind unbehandelte, nicht-transduzierte Zellen als Kontrollen dargestellt. *** = $p < 0,001$

Dabei zeigte die Messung der LDH-Konzentration im Zellkulturmedium eine dosisabhängige Reduktion der Toxizität verglichen mit nicht-behandelten Zellen: Mit 2 μ M Trifluoperazin konnte eine Reduktion der Toxizität um 28,8 % (95%iges Konfidenzintervall 22,1 % bis 35,5 %), mit 4 μ M Trifluoperazin um 33,1 % (95%iges Konfidenzintervall 26,4 % bis 39,8 %) und mit 8 μ M um 43,0 % (95%iges Konfidenzintervall 36,2 % bis 49,8 %) erreicht werden (Abbildung 11). Die Ergebnisse waren dabei allesamt statistisch signifikant mit einem p-Wert $< 0,001$ im Vergleich zu nur mit dem adenoviralen Vektor transduzierten Zellen. Auch zwischen den

einzelnen Trifluoperazin-Dosierungen zeigten sich statistisch signifikante Unterschiede im Sinne einer dosisabhängigen Reduktion der Toxizität – lediglich der Unterschied zwischen einer Behandlung mit 2 μ M und 4 μ M erreichte nicht das Signifikanzniveau von 0,05.

In der Zellzählung zeigte sich ein vergleichbares Bild: So war in den Wells mit Alpha-Synuklein-überexprimierenden LUHMES-Neuronen eine Reduktion vitaler Zellen im Vergleich zu nicht-transduzierten Kontrollzellen um 46,9 % (95%iges Konfidenzintervall 27,4 % bis 66,4 %; $p < 0,001$; Abbildung 12 E) zu sehen. Dieser Verlust an vitalen Zellen durch die Überexpression von Alpha-Synuklein konnte durch die Behandlung mit Trifluoperazin zum Teil umgekehrt werden: Relativ zu nur mit adenoviralen Vektoren transduzierten Zellen wurden bei Behandlung mit 2 μ M Trifluoperazin 40,9 % (95%iges Konfidenzintervall 9,3 % bis 72,4 %; $p < 0,01$) mehr vitale Zellen, bei Behandlung mit 4 μ M Trifluoperazin 47,5 % (95%iges Konfidenzintervall 15,2 % bis 79,7 %; $p < 0,001$) und bei Behandlung mit 8 μ M Trifluoperazin 70,4 % (95%iges Konfidenzintervall 37,8 % bis 103 %; $p < 0,001$) mehr vitale Zellen gezählt. Wie man der Abbildung 12 entnehmen kann, zeigte sich hierbei eine klare Tendenz zur Dosisabhängigkeit – auch wenn zwischen den einzelnen Trifluoperazin-Behandlungsgruppen eine Signifikanz im Tukey-Test als Post-hoc-Test knapp verfehlt wurde.

Weiterhin wurden noch nach morphologischen Kriterien die apoptotischen Zellen gezählt (Kroemer et al., 2009). Dies bestätigte wiederum das Bild von LDH-Messung und Zählung der vitalen Zellen. Die Überexpression von Alpha-Synuklein führte zu einer deutlichen Steigerung apoptotischer Zellen im Vergleich zu nicht-transduzierten Zellen ($p < 0,001$; Abbildung 12 F). Dagegen konnte die Behandlung mit Trifluoperazin die Anzahl morphologisch apoptotischer Zellen hochsignifikant reduzieren. Bei einer Behandlung mit 2 μ M Trifluoperazin kam es zu einer Reduktion der Anzahl der apoptotischen Zellen um 48,0 % (95%iges Konfidenzintervall 34,3 % bis 61,7 %; $p < 0,001$), bei 4 μ M zu einer Reduktion um 57,1 % (95%iges Konfidenzintervall 43,1 % bis 71,1 %; $p < 0,001$) und bei 8 μ M zu einer Reduktion um 65,5 % (95%iges Konfidenzintervall 51,3 % bis 79,6 %; $p < 0,001$). Auch bei der Zählung der apoptotischen Zellen zeigte sich bei der Betrachtung der Mittelwerte eine dosisabhängige Neuroprotektion durch Trifluoperazin.

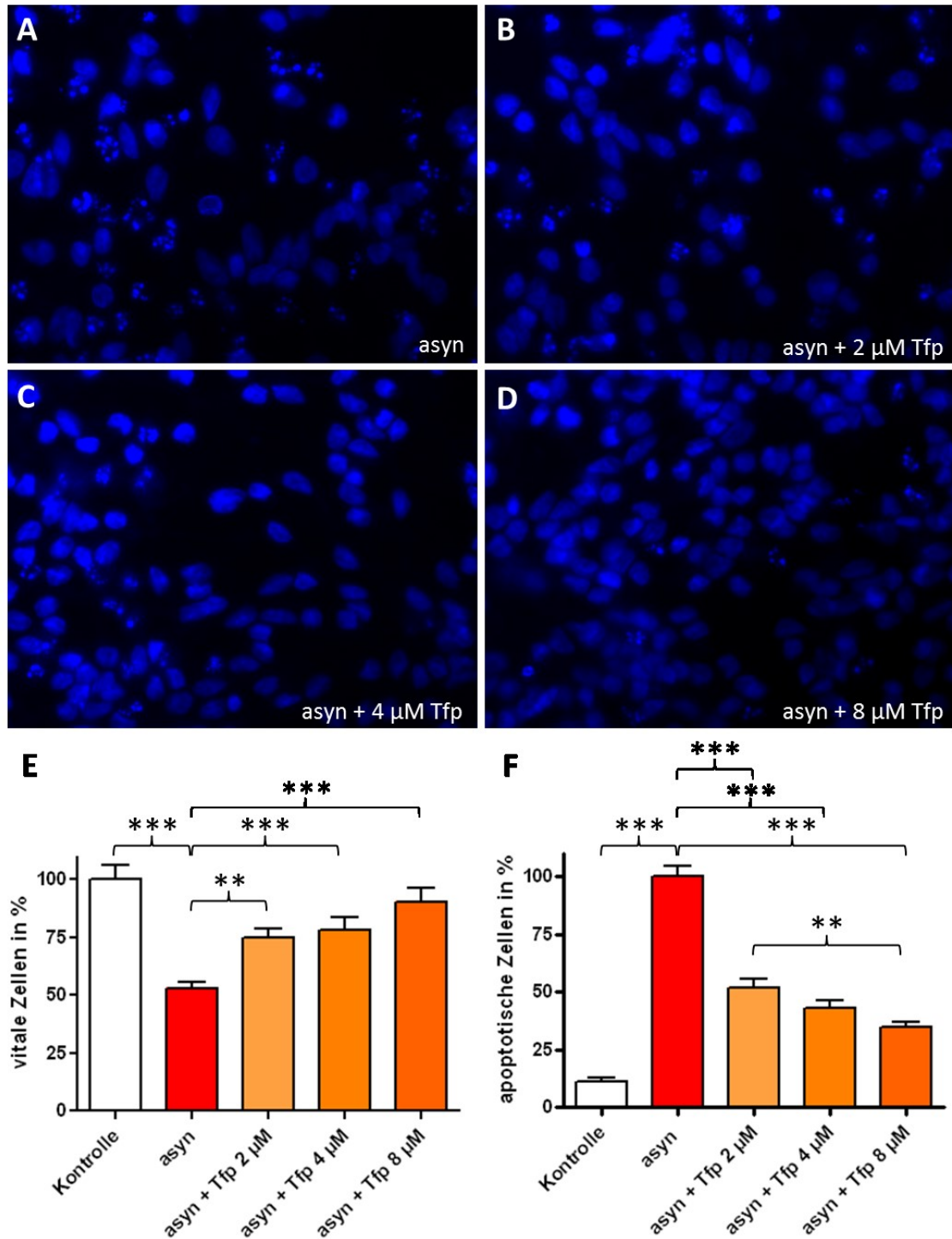


Abbildung 12: Trifluoperazin schützte vor Alpha-Synuklein-Wildtyp-induziertem Zelltod. **A-D** exemplarische Ausschnitte von mit DAPI gefärbten Zellen sechs Tage nach der adenoviralen Transduktion zur Überexpression von Wildtyp-Alpha-Synuklein. **A** zeigt Zellen, die neben der Transduktion keine spezielle Behandlung erhalten haben. **B-D** zeigt Zellen, die einen Tag nach der Transduktion zusätzlich mit 2 μ M, 4 μ M oder 8 μ M Trifluoperazin (Tfp) behandelt wurden. In **A** erkennt man die höchste Dichte an Zellkernen mit Kernfragmentierung (Karyorrhexis), Kernpyknose und Zellabrundung – jeweils als morphologische Merkmale eines apoptotischen Zelltods (Kroemer et al., 2009). Unter zunehmender Konzentration von Trifluoperazin kam es zu einer Abnahme dieser karyorrhektischen, pyknotischen und abgerundeten Zellkerne. **E** stellt den Prozentsatz an morphologisch vitalen Zellen dar in Relation zu den nicht-transduzierten Kontrollzellen (Kontrolle = 100 %). Die Anzahl an morphologisch vitalen Zellen nahm unter Alpha-Synuklein-Überexpression (asyn) signifikant ab und stieg dosisabhängig unter Trifluoperazin-Behandlung wieder an. **F** illustriert den Prozentsatz an morphologisch

apoptotischen Zellen in Relation zu der Anzahl an apoptotischen Zellen bei transduzierten Zellen (asyn = 100 %). Die Anzahl an morphologisch apoptotischen Zellen sank unter Trifluoperazin-Behandlung dosisabhängig ab. ** = $p < 0,01$ *** = $p < 0,001$

3.3 Trifluoperazin reduzierte spezifisch eine 37-kDa-Alpha-Synuklein-Western-Blot-Bande

Neben der Auswertung zur Überprüfung der Toxizität bzw. Neuroprotektion wurden sechs Tage nach der Transduktion der Zellen auch Zell-Lysate eingesammelt, um Western Blots durchzuführen. Wie erwartet, führte die Überexpression von Wildtyp-Alpha-Synuklein zu einer deutlichen Verstärkung der Alpha-Synuklein-Monomer-Bande (16 kDa) (Abbildung 13 A und C). Weiterhin zeichnete sich bei Überexpression von Wildtyp-Alpha-Synuklein eine 37-kDa-Alpha-Synuklein-Bande deutlich ab, die in nicht-transduzierten Zellen nicht nachweisbar war. Interessanterweise nahm diese Alpha-Synuklein-Bande unter Behandlung mit Trifluoperazin dosisabhängig an Intensität ab (Abbildung 13 A und B). Die Reduktion der Bandenintensität zwischen nicht mit Trifluoperazin behandelten transduzierten Zellen und transduzierten Zellen, welche mit 8 μM Trifluoperazin behandelt wurden, betrug 71,7 % ($p < 0,01$). Die Reduktion durch eine Behandlung mit 2 μM und 4 μM lag bei 24,4 % (n.s.) respektive 34,8 % (n.s.). Dagegen zeigten sich keine signifikanten Veränderungen bei der Monomer-Bande oder den restlichen Alpha-Synuklein-Banden unter Behandlung mit Trifluoperazin im Vergleich zu nur transduzierten LUHMES-Neuronen (Abbildung 13 C-E).

Um diese Ergebnisse weiter zu erhärten und um auszuschließen, dass es sich bei der 37-kDa Bande um eine unspezifische Bindungsreaktion des primären Alpha-Synuklein-Antikörpers (sc-7011-R) handelt, wurden diese Western Blots auch mit einem zweiten Alpha-Synuklein-Antikörper (AB5038P) bestätigt (Abbildung 13 F und G).

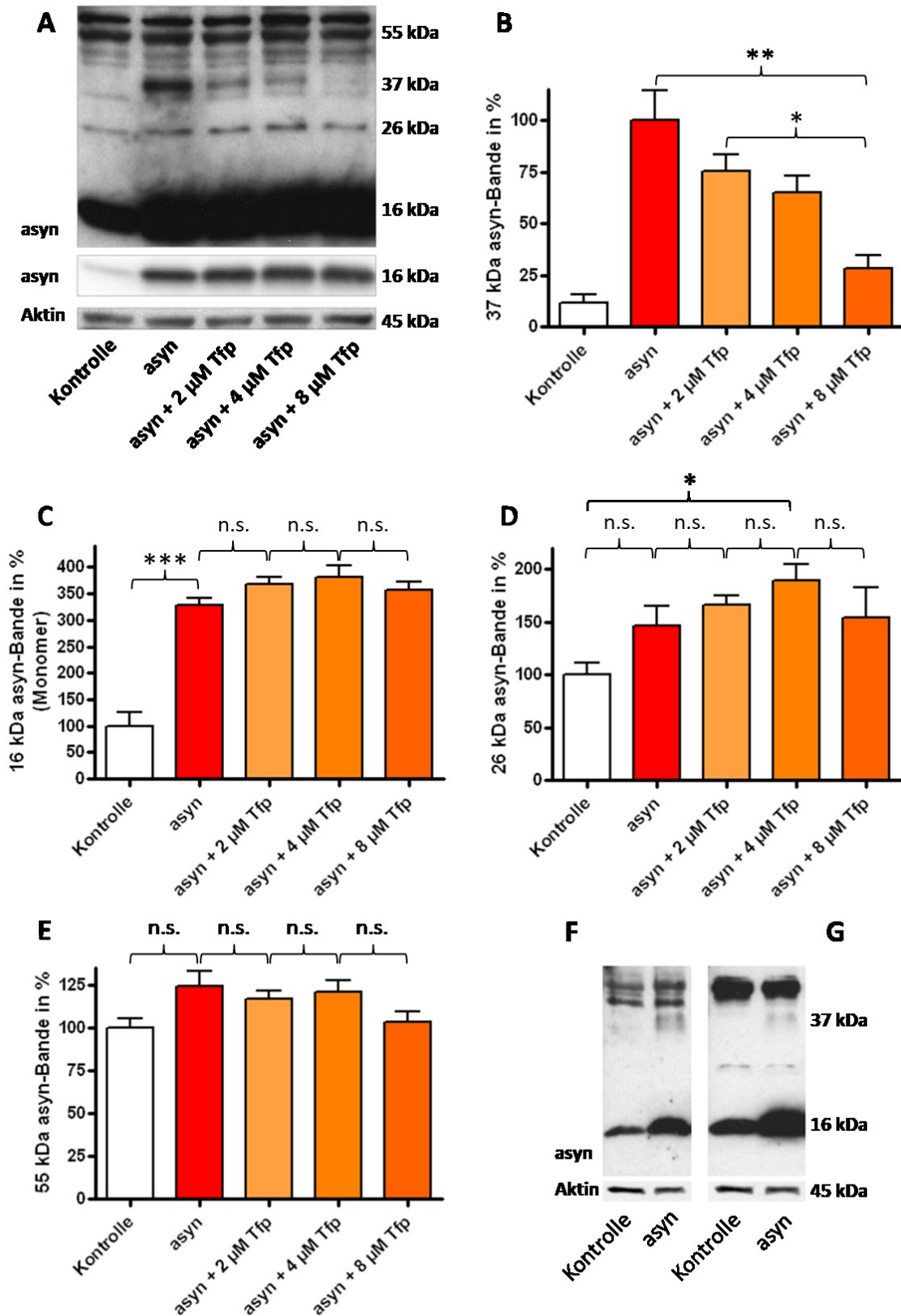


Abbildung 13: Trifluoperazin reduzierte spezifisch und signifikant eine 37-kDa-Alpha-Synuklein-Bande. **A** zeigt einen Western Blot mit einem Alpha-Synuklein-Antikörper (C-20, sc-7011-R) von Zell-Lysaten sechs Tage nach Transduktion mit einem adenoviralen Vektor, der den Alpha-Synuklein-Wildtyp überexprimierte (asyn). Die obere „asyn“-Abbildung in **A** zeigt den kompletten Western Blot, die untere „asyn“-Abbildung demonstriert lediglich die 16-kDa-Monomer-Bande nach kürzerer Entwicklungszeit. Ganz unten ist die Ladungskontrolle mittels

Aktin-Antikörper dargestellt. Die Überexpression von Wildtyp-Alpha-Synuklein intensivierte die Alpha-Synuklein-Monomer-Bande deutlich. Zudem kam unter Überexpression eine 37-kDa-Alpha-Synuklein-Bande zur Darstellung, welche in der Kontrolle nicht sichtbar war. Die Behandlung mit Trifluoperazin (Tfp) führte dosisabhängig zu einer Reduktion dieser Bande, während weder andere Oligomer-Banden noch die Monomer-Bande verändert zur Darstellung kamen. B zeigt die Quantifizierung der 37-kDa-Alpha-Synuklein-Bande von > 3 biologischen Replikaten des Experiments in A. Dabei wurde die Bandenstärke relativ zu der Bandenstärke von transduzierten Zellen ohne Trifluoperazin-Behandlung quantifiziert (asyn = 100 %).

C-E zeigen quantitative Analysen von drei weiteren Alpha-Synuklein-Banden (jeweils Kontrolle = 100 %). Dabei zeigte sich unter Überexpression von Wildtyp-Alpha-Synuklein eine deutliche, signifikante Intensivierung der 16-kDa-Monomer-Bande im Vergleich zu Kontrollzellen. Die 26-kDa-Bande zeigte zwar nach Transduktion einen gewissen Anstieg der Intensität, welcher aber nur im Vergleich mit 4 µM Trifluoperazin (Tfp) knapp signifikant war. Und die 55-kDa-Alpha-Synuklein-Bande blieb nahezu unverändert. Insbesondere ergibt sich – im Gegensatz zur 37-kDa-Bande – bei keiner der drei Banden ein signifikanter Unterschied unter Behandlung mit Trifluoperazin im Vergleich zu lediglich mittels adenoviraler Vektoren transduzierten Zellen.

F und G zeigen Western Blots ein und derselben Proben zum Vergleich der beiden primären Alpha-Synuklein-Antikörper sechs Tage nach Transduktion mit einem adenoviralen Vektor, der den Alpha-Synuklein-Wildtyp überexprimierte (asyn). In F wurde ein Alpha-Synuklein-Antikörper von Merck Millipore verwendet und in G der (C-20)-R-Alpha-Synuklein-Antikörper von Santa Cruz, der auch bei den übrigen Western Blots verwendet wurde. Insbesondere die 37-kDa-Bande wurde auch durch den Merck Millipore Antikörper detektiert.

* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$; n.s. = nicht signifikant

3.4 Chloroquin erhöhte die Wildtyp-Alpha-Synuklein-induzierte Toxizität in LUHMES-Neuronen

Chloroquin ist ein Inhibitor der Autophagie (siehe auch „Material und Methoden“). Aus diesem Grund wurde es verwendet, um bei Trifluoperazin-Behandlung den Nachweis zu erbringen, dass tatsächlich eine verstärkte Autophagosomen-Bildung erfolgte und nicht eine Blockade des Autophagosomen-Abbaus (s.o.). Trifluoperazin führte zu einer Aktivierung der Autophagie in LUHMES-Neuronen und schützte diese Zellen vor Alpha-Synuklein-Wildtyp-induzierter Toxizität. Im Umkehrschluss sollte also die Blockade der Autophagie mittels Chloroquin zu einer verstärkten Toxizität führen. Um dies zu prüfen, wurden LUHMES-Neurone, die mit Wildtyp-Alpha-Synuklein exprimierenden adenoviralen Vektoren transduziert wurden, fünf Tage nach der Transduktion für 24 Stunden mit 100 µM Chloroquin behandelt. Dabei zeigte sich eine signifikante Zunahme der Toxizität: Im Zellkulturmedium wurde eine Zunahme der LDH-Konzentration um 14 % gemessen im Vergleich zu nur transduzierten Zellen (95%iges Konfidenzintervall 9,5 % bis 18,4 %). Einen signifikanten Unterschied zwischen unbehandelten Kontrollzellen und Kontrollzellen, welche 24 Stunden mit 100 µM Chloroquin behandelt wurden, ergab sich dagegen nicht (Abbildung 14). Um zu demonstrieren, dass die gesteigerte Toxizität durch Chloroquin nicht durch jedwede Proteinüberexpression ausgelöst werden kann, wurden zudem GFP-überexprimierende Zellen für 24 Stunden mit 100 µM behandelt. Ebenso wie bei nicht-transduzierten Zellen zeigte sich dabei keine signifikante Zunahme der Toxizität.

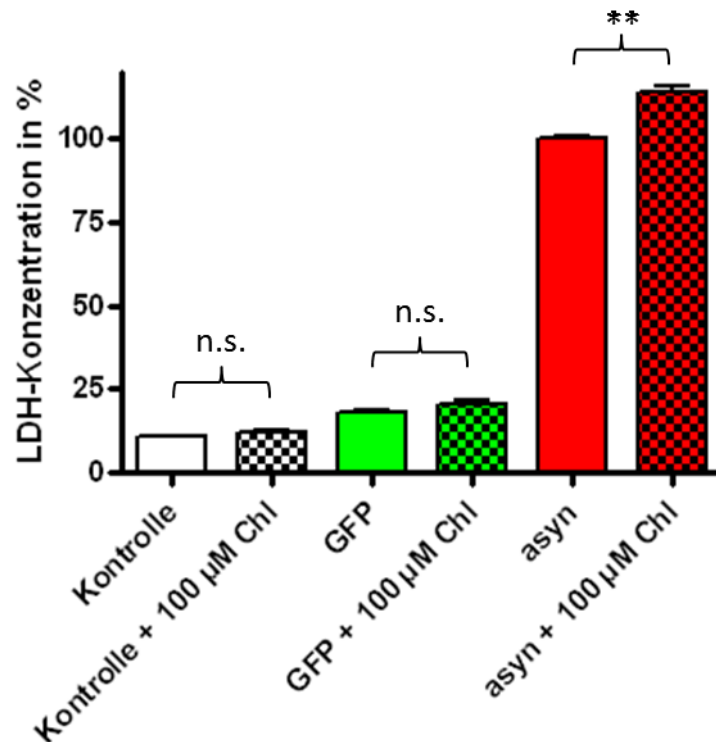


Abbildung 14: Chloroquin als Inhibitor der Autophagie steigerte die Alpha-Synuklein-induzierte Toxizität. Die LDH-Konzentration der verschiedenen Bedingungen ist angegeben in Relation zu LUHMES-Zellen, die mittels eines adenoviralen Vektors transduziert wurden und den Alpha-Synuklein-Wildtyp überexprimierten (asyn = 100 %). Eine zusätzliche Behandlung der transduzierten Zellen mit 100 µM des Autophagie-Inhibitors Chloroquin (Chl) für 24 Stunden steigerte die Toxizität signifikant, während sowohl bei nicht-transduzierten Kontrollzellen als auch bei LUHMES-Neuronen, die über eine adenovirale Transduktion GFP überexprimierten (GFP), eine Behandlung mit 100 µM Chloroquin nicht zu einer signifikanten Steigerung der Toxizität führte. ** = $p < 0,01$; n.s. = nicht signifikant

3.5 Chloroquin verstärkte die 37-kDa-Alpha-Synuklein-Western-Blot-Bande

Neben der Messung der LDH-Konzentration erfolgte 24 Stunden nach der Behandlung der Zellen mit Chloroquin auch die Sammlung von Zell-Lysaten zur Erstellung von Western Blots. Unter Aktivierung der Autophagie durch Trifluoperazin hatte man eine Abnahme insbesondere einer 37-kDa-Alpha-Synuklein-Western-Blot-Bande gesehen. Bei Blockade der Autophagie durch Chloroquin wäre also eine Verstärkung dieser Bande zu erwarten. Und tatsächlich zeigte sich unter Behandlung mit Chloroquin eine signifikante Zunahme der 37-kDa-Alpha-Synuklein-Bande als weiterer Hinweis darauf, dass diese Alpha-Synuklein-Bande ein Substrat der Autophagie ist und dementsprechend bei Blockade der Autophagie durch Chloroquin akkumuliert (Abbildung 15 A). Anhand von drei biologischen Replikaten erfolgte zudem eine

Quantifizierung der Western Blots, dabei zeigte sich eine 60,7%ige Zunahme der 37-kDa-Bandenstärke unter 24-stündiger Chloroquin-Behandlung (95%iges Konfidenzintervall 16,5 % bis 105,0 %; Abbildung 15 B). Die Bandenstärke der Monomere veränderte sich dagegen durch eine Autophagie-Blockade durch Chloroquin nicht. Zudem konnte man in den Zell-Lysaten der nicht-transduzierten Zellen auch unter Autophagie-Blockade die 37-kDa-Alpha-Synuklein-Western-Blot-Bande nicht sicher abgrenzen.

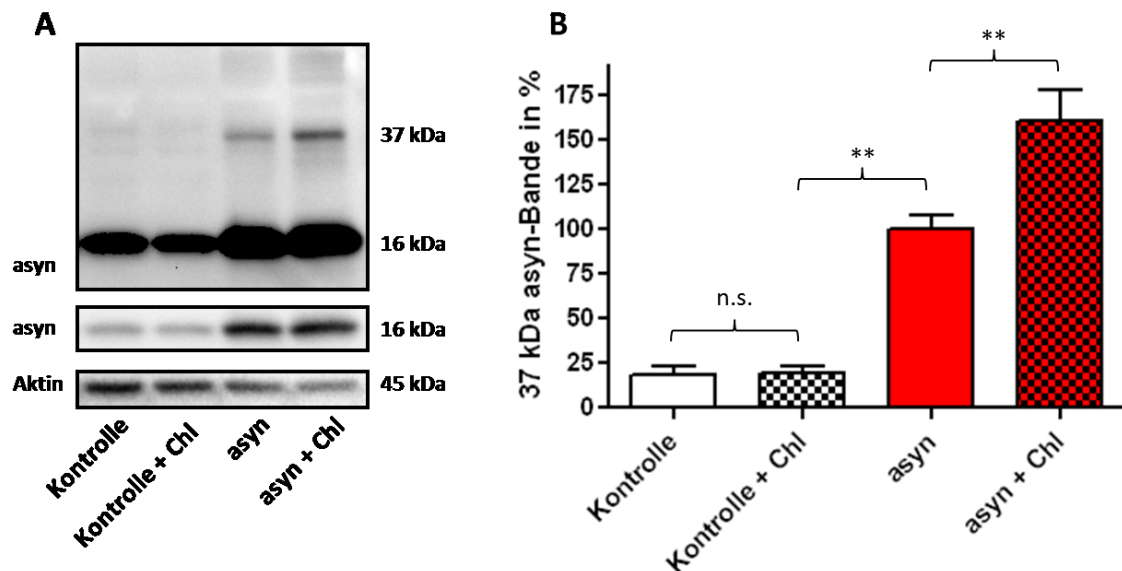


Abbildung 15: Zunahme einer 37-kDa-Alpha-Synuklein-Bande unter Chloroquin-Behandlung. **A** zeigt einen Western Blot von Zell-Lysaten sechs Tage nach Transduktion mit adenoviralen Vektoren, die den Alpha-Synuklein-Wildtyp überexprimierten. Dabei beinhalten die beiden linken Spuren Zell-Lysate nicht-transduzierter LUHMES-Zellen (Kontrolle) und die rechten beiden Spuren Zell-Lysate transduzierter Zellen (asyn). In der oberen Abbildung ist der gesamte Western Blot dargestellt. Die mittlere Abbildung zeigt lediglich die Alpha-Synuklein-Monomere (16 kDa) nach kürzerer Expositionszeit. Die untere Abbildung zeigt die Aktinkontrolle. Unter 24-stündiger Behandlung mit 100 μ M Chloroquin (Chl) kam es bei den transduzierten Zellen zu einer Intensitätszunahme der 37-kDa-Bande, wohingegen diese Bande bei nicht-transduzierten Zellen überhaupt nicht sicher abgrenzbar war. Die Alpha-Synuklein-Monomere wurden dagegen durch eine Chloroquin-Behandlung nicht beeinflusst. **B** zeigt die Quantifizierung der 37-kDa-Alpha-Synuklein-Bande von Western Blots von drei biologischen Replikaten, des in **A** beschriebenen Experiments. Die Angabe erfolgt in Prozent (asyn = 100 %). Die Quantifizierung demonstriert eine signifikante Zunahme der 37-kDa-Bande unter 24-stündiger Chloroquin-Behandlung bei transduzierten Zellen, während sich bei den nicht-transduzierten Kontrollzellen keine Änderung zeigte. ** = $p < 0,01$; n.s. = nicht signifikant

3.6 Hemmung der Degradation von Autophagosomen/Lysosomen durch Alpha-Synuklein-Wildtyp-Überexpression

Es ist weiterhin ungeklärt, ob der Alpha-Synuklein-Wildtyp eine Hemmung der Autophagie (Winslow et al., 2010) oder eine Aktivierung der Autophagie bewirkt (Choubey et al., 2011; Stefanis et al., 2001). Zur Beantwortung dieser Frage in dem hier verwendeten Zellmodell dienten als Kontrollzellen sowohl nicht-transduzierte LUHMES-Neurone als auch LUHMES-Neurone, die GFP überexprimierten. Sechs Tage nach der Transduktion wurden Zell-Lysate von Alpha-Synuklein-Wildtyp-überexprimierenden Zellen, GFP-überexprimierenden Zellen und von nicht-transduzierten Kontrollzellen gesammelt. Zudem wurden auch jeweils Zell-Lysate gesammelt, welche zusätzlich 24 Stunden mit 100 μ M Chloroquin behandelt wurden.

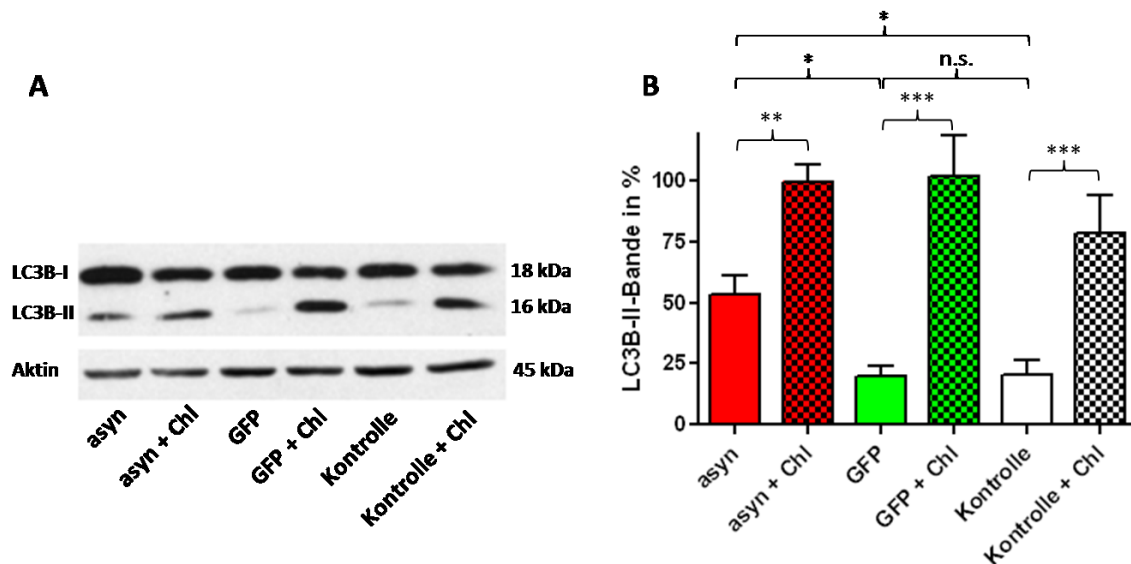


Abbildung 16: Überexpression des Alpha-Synuklein-Wildtyps hemmt die Degradation von Autophagosomen und führte zu einer ineffizienteren Autophagie in LUHMES-Neuronen. **A** zeigt einen Western Blot von Zell-Lysaten sechs Tage nach Transduktion mittels adenoviraler Vektoren, die den Alpha-Synuklein-Wildtyp (asyn) oder GFP überexprimierten (GFP), sowie von Zell-Lysaten nicht-transduzierter Kontrollzellen (Kontrolle). Die untere Abbildung stellt die Aktinkontrolle dar. Die Überexpression des Alpha-Synuklein-Wildtyps führte zu einer Intensitätszunahme der entscheidenden LC3B-II-Bande (erste Spur) im Vergleich zu Zellen, die GFP überexprimierten (dritte Spur) und im Vergleich zu Kontrollzellen (fünfte Spur). In Alpha-Synuklein-überexprimierenden Zellen führte die zusätzliche 24-stündige Behandlung mittels 100 μ M Chloroquin (Chl) nur zu einer geringen Zunahme der LC3B-II-Bandenstärke (zweite Spur), wohingegen die Chloroquin-Behandlung in GFP-überexprimierenden Zellen und Kontrollzellen zu einer deutlich stärkeren Zunahme der LC3B-II-Bande führte (vierte und sechste Spur). **B** zeigt die Quantifizierung der LC3B-II-Bande von vier biologischen Replikaten des in **A** beschriebenen Experiments. Angabe in Prozent (asyn + Chl = 100 %). * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$; n.s. = nicht signifikant

Unter Überexpression von Wildtyp-Alpha-Synuklein zeigte sich eine Verstärkung der LC3B-II-Bande im Vergleich zu GFP-überexprimierenden Zellen und nicht-transduzierten Zellen. Wie oben und im Abschnitt „Material und Methoden“ erläutert, kann dies entweder durch eine verstärkte Bildung der Autophagosomen oder durch eine reduzierte lysosomale Degradation

der Autophagosomen, also eine Hemmung der Autophagie, bedingt sein. Tatsächlich war unter 24-stündiger Blockade der Autophagie mittels 100 μM Chloroquin der Intensitätsanstieg der LC3B-II-Bande der Alpha-Synuklein-Wildtyp-überexprimierenden Zellen deutlich schwächer ausgeprägt als bei den GFP-überexprimierenden Zellen und den nicht-transduzierten Zellen (Abbildung 16). Dies lässt den Schluss zu, dass in diesem Zellmodell die Überexpression von Wildtyp-Alpha-Synuklein zu einer ineffizienteren Autophagie führte. Da sich diese ineffizientere Autophagie auch eindeutig im Vergleich zu GFP-überexprimierenden Zellen zeigte, wird diese offensichtlich nicht allein durch eine Proteinüberladung ausgelöst.

3.7 Zusammenhang zwischen der 37-kDa-Alpha-Synuklein-Western-Blot-Bande und Toxizität

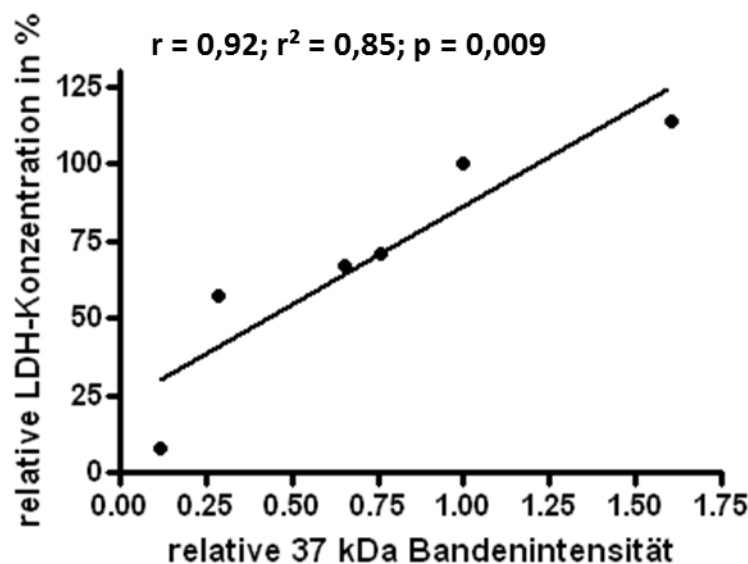


Abbildung 17: Korrelation zwischen der Bandenintensität der 37-kDa-Alpha-Synuklein-Western-Blot-Bande (Daten entsprechen den Daten aus den Abbildungen 13 B und 15 B) und der Toxizität gemessen an der relativen LDH-Konzentration im Zellkulturmedium (Daten entsprechen den Daten aus den Abbildungen 11 und 14). Der Datenpunkt 100 % relative LDH-Konzentration und 1,00 relative 37-kDa-Bandenintensität entspricht LUHMES-Zellen, die mit adenoviralen Vektoren transduziert wurden, die den Alpha-Synuklein-Wildtyp überexprimierten. Die verwendeten Datenpunkte beinhalten die Daten von nicht-transduzierten LUHMES-Zellen (geringste LDH-Konzentration und geringste relative 37-kDa-Bandenintensität) sowie Alpha-Synuklein-überexprimierenden Zellen, die lediglich transduziert waren, zusätzlich über fünf Tage mit 2 μM Trifluoperazin, 4 μM Trifluoperazin, 8 μM Trifluoperazin oder zusätzlich 24 Stunden mit 100 μM Chloroquin (höchste LDH-Konzentration und höchste relative 37-kDa-Bandenintensität) behandelt wurden. Der Korrelationskoeffizient r , das Bestimmtheitsmaß r^2 und der p -Wert wurden nach Pearson berechnet. Die Abbildung zeigt eine starke positive Korrelation zwischen 37-kDa-Bande und der LDH-Konzentration.

In den oben beschriebenen Experimenten konnte beobachtet werden, dass Trifluoperazin dosisabhängig vor Alpha-Synuklein-induzierter Toxizität schützt. Weiterhin wurde beobachtet,

dass unter Trifluoperazin die Intensität einer 37-kDa-Alpha-Synuklein-Western-Blot-Bande abnahm. Im gleichen Sinne zeigte sich in Alpha-Synuklein-überexprimierenden LUHMES-Zellen unter 24-stündiger Behandlung mit Chloroquin bei zunehmender Toxizität eine Zunahme der 37-kDa-Alpha-Synuklein-Western-Blot-Bande. Um diesen Zusammenhang graphisch und statistisch zu untermauern wurden mit den in den oberen Experimenten erhobenen Daten Korrelationsanalysen durchgeführt. Dabei zeigte sich eine signifikante positive Korrelation der Intensität der 37-kDa-Bande mit der anhand der LDH-Konzentration gemessenen Toxizität (Abbildung 17). Dazu wurde der Pearson-Korrelationskoeffizient (r) berechnet, dieser lag bei 0,92, das Bestimmtheitsmaß (r^2) lag bei 0,85 ($p = 0,009$).

Invers dazu ergab sich eine signifikante negative Korrelation zwischen der Bandenintensität und der Anzahl vitaler Zellen ($r = -0,97$; $r^2 = 0,95$; $p = 0,0005$; Abbildung 18 A). Passend dazu ist die Stärke der 37-kDa-Bande mit der Anzahl der apoptotischen Zellen wiederum positiv korreliert ($r = 0,92$; $r^2 = 0,85$; $p = 0,026$; Abbildung 18 B).

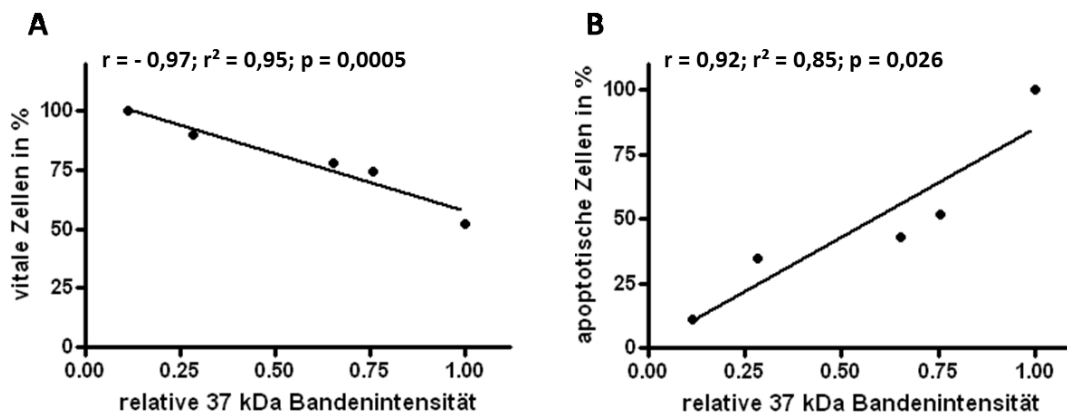


Abbildung 18: **A** zeigt die Korrelation zwischen der 37-kDa-Alpha-Synuklein-Western-Blot-Bande (Daten entsprechen den Daten aus der Abbildung 13 B) und den vitalen Zellen (Daten entsprechen den Daten aus der Abbildung 12 E). 100 % vitale Zellen entspricht der Anzahl an vitalen Zellen in nicht-transduzierten Kontrollzellen, die relative 37-kDa-Bandenintensität von 1,00 entspricht der Bandenintensität in LUHMES-Zellen, die mittels adenoviralen Vektoren transduziert wurden, die den Alpha-Synuklein-Wildtyp überexprimierten. Die restlichen Datenpunkte entsprechen transduzierten Zellen, die zusätzlich mit 2 μ M, 4 μ M oder 8 μ M Trifluoperazin behandelt wurden. Es zeigte sich eine hochsignifikante negative Korrelation. **B** zeigt die Korrelation zwischen der 37-kDa-Alpha-Synuklein-Western-Blot-Bande (Daten entsprechen den Daten aus der Abbildung 13 B) und der Anzahl apoptotischer Zellen (Daten entsprechen den Daten aus der Abbildung 12 F). Der Datenpunkt 100 % apoptotische Zellen und 1,00 relative 37-kDa-Bandenintensität entspricht LUHMES-Zellen, die den Alpha-Synuklein-Wildtyp überexprimierten. Die weiteren Datenpunkte entsprechen nicht-transduzierten Kontrollzellen sowie transduzierten Zellen, die zusätzlich mit 2 μ M, 4 μ M oder 8 μ M Trifluoperazin behandelt wurden. Der Korrelationskoeffizient r , das Bestimmtheitsmaß r^2 und der p -Wert wurden nach Pearson berechnet.

4 Diskussion

Bis zum jetzigen Zeitpunkt gibt es keine Therapie, die den progredienten Krankheitsverlauf der Parkinson-Krankheit nachgewiesenermaßen aufhalten oder verlangsamen kann (Worth, 2013). Zudem ist die Pathophysiologie der Parkinson-Krankheit weiterhin nicht ausreichend geklärt (Kiebertz and Wunderle, 2013; Samii et al., 2004). Es ist deswegen von äußerster Wichtigkeit neue therapeutische Ansätze zu finden, welche in die Pathophysiologie der Parkinson-Krankheit eingreifen. Mehrere Hinweise implizieren eine entscheidende Rolle des Proteins Alpha-Synuklein in der Entstehung der Parkinson-Krankheit, ohne dass bisher die genaue Alpha-Synuklein-Form identifiziert wurde, welche für die Toxizität von Alpha-Synuklein verantwortlich ist.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein neues Zellkulturmodell der Parkinson-Krankheit verwendet, welches auf der Überexpression von Alpha-Synuklein basiert (Höllerhage, Goebel et al., 2014). Ziel der Arbeit war es insbesondere zu untersuchen, ob eine Aktivierung der Autophagie durch den bekannten Autophagie-Aktivator Trifluoperazin protektiv in einem solchen Modell wirkt. Weiterhin sollte die Wirkung von Alpha-Synuklein auf die Autophagie sowie die Auswirkung der Autophagie-Aktivierung auf Alpha-Synuklein untersucht werden.

In diesem neuen Zellmodell wurden LUHMES-Zellen verwendet, die nach der Zugabe eines Differenzierungsmediums zu Zellen differenzieren, die morphologisch und biochemisch gereiften dopaminergen Neuronen stark ähneln (Lotharius et al., 2005). Der Verlust dopaminergischer Neurone der *Substantia nigra pars compacta* ist bekanntlich hauptverantwortlich für die motorischen Symptome der Erkrankung (Blandini et al., 2000; Ehringer and Hornykiewicz, 1960). Mittels adenoviraler Transduktion wurde in diesen Zellen die Überexpression des Alpha-Synuklein-Wildtyps bewirkt. Dies führte zu einer circa 50%igen Toxizität im Verlauf von sechs Tagen nach der Transduktion (Höllerhage, Goebel et al., 2014). Dieses Zellmodell der Parkinson-Krankheit ist ein nützliches Instrument, um Substanzen zu testen, die die Toxizität innerhalb dieses Modells beeinflussen: Eine circa 50%ige Toxizität gibt genügend Spielraum, um durch protektive Substanzen Alpha-Synuklein-Wildtyp-überexprimierende Zellen zu schützen; zudem ist es noch möglich durch schädigende Substanzen eine erhöhte Toxizität auszulösen. Weiterhin erlaubt die Zeitspanne von sechs Tagen auch genügend Zeit zur pharmakologischen Beeinflussung der Toxizität.

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst nachgewiesen, dass Trifluoperazin tatsächlich auch in LUHMES-Neuronen die Autophagie aktiviert. Anschließend konnte unter dem Einfluss von Trifluoperazin eine dosisabhängige Protektion der LUHMES-Neurone vor Alpha-Synuklein-

Wildtyp-vermittelter Toxizität beobachtet werden. Passend dazu wurde durch die Gabe von Chloroquin, einem Inhibitor der Autophagie, eine Zunahme der Toxizität dokumentiert. Weiterhin konnte in der Analyse von Alpha-Synuklein mittels Western Blot eine 37-kDa-Alpha-Synuklein-Bande identifiziert werden, die unter Trifluoperazin dosisabhängig an Intensität abnahm und unter Autophagie-Blockade an Intensität zunahm. In Korrelationsanalysen zeigte sich eine hochsignifikante positive Korrelation zwischen der Toxizität und dieser identifizierten Alpha-Synuklein-Bande. Eine weitere Beobachtung war, dass die Überexpression von Alpha-Synuklein zu einer ineffizienteren Autophagie führte.

4.1 Erkenntnisse hinsichtlich der Beziehung zwischen Alpha-Synuklein und Autophagie

Wie in der Einleitung ausgeführt, gibt es insbesondere drei wichtige Fragen hinsichtlich Alpha-Synuklein und Autophagie:

1. Führt eine Aktivierung der Autophagie zu einer Protektion in einem auf Alpha-Synuklein-Überexpression basierenden Parkinson-Krankheit-Modell oder wirkt eine Aktivierung der Autophagie gar toxisch?
2. Wird Alpha-Synuklein durch Autophagie abgebaut und falls ja, welche Alpha-Synuklein-Form(en) wird oder werden durch Autophagie abgebaut?
3. Wie wirkt Alpha-Synuklein selbst auf die Autophagie – aktivierend oder hemmend?

Alle diese drei Fragen konnten in der vorliegenden Arbeit – zumindest für das vorliegende Zellmodell – beantwortet werden und sollen im Folgenden nochmals näher beleuchtet werden.

Zur ersten Frage, ob eine Aktivierung der Autophagie protektiv oder schädigend in einem auf Alpha-Synuklein-Überexpression basierenden Parkinson-Krankheit -Modell wirkt:

Autophagie ist ein Mechanismus, um überflüssige oder toxische Proteinaggregate, die nicht durch das Proteasom abgebaut werden können, und ausgediente Organellen abzubauen (Lilienbaum, 2013; Lynch-Day et al., 2012; Ravikumar et al., 2002). Es ist der wichtigste Mechanismus zur Elimination langlebiger Makromoleküle und ganzer Organellen (Cuervo et al., 2004; Shintani and Klionsky, 2004). Die Aktivierung der Autophagie könnte also in einer Erkrankung, in der fehlgefaltetes Alpha-Synuklein neurodegenerativ wirkt, ein potentieller therapeutischer Ansatz sein.

Bisher ist die Frage allerdings ungeklärt, ob Autophagie im Zusammenhang mit Synukleinopathien tatsächlich protektiv wirkt oder sogar schädlich: Die Ergebnisse einiger Studien deuteten auf einen protektiven Effekt durch Aktivierung der Autophagie hin (Dadakhujiev et al., 2010; Hebron et al., 2013; Lee et al., 2004; Spencer et al., 2009; Steele et al., 2013), während andere Studien negative Effekte der Autophagie in Parkinson-Krankheit-Modellen beobachteten (Choubey et al., 2011; Li et al., 2011; Xilouri et al., 2009).

Um die Frage zu klären, ob die Aktivierung der Autophagie vor Alpha-Synuklein-induziertem Zelltod in dem hier verwendeten Zellmodell schützt, wurde in der vorliegenden Arbeit Trifluoperazin als Substanz ausgewählt. Denn Trifluoperazin ist bekannterweise ein potenter Aktivator der Autophagie in Neuronen (Tsvetkov et al., 2010; Zhang et al., 2007). Zunächst wurde gezeigt, dass Trifluoperazin auch in LUHMES-Neuronen die Autophagie aktiviert. Dazu wurden Western Blots zur Messung der LC3B-II-Bande durchgeführt. Das Protein LC3B-II korreliert mit der Menge an Autophagosomen (Klionsky et al., 2012). Trifluoperazin führte in LUHMES-Neuronen dosisabhängig zu einer Steigerung der LC3B-II-Bandenintensität, welche unter Hinzugabe des Autophagie-Inhibitors Chloroquin nochmals deutlich zunahm. Anschließend wurden Experimente durchgeführt, um zu beobachten, ob diese Aktivierung der Autophagie durch Trifluoperazin im verwendeten Zellmodell der Parkinson-Krankheit vor Zelltod schützt oder vielleicht sogar toxisch wirkt. Dabei konnte eine dosisabhängige Protektion der LUHMES-Neurone vor Alpha-Synuklein-Wildtyp-vermittelter Toxizität nachgewiesen werden. Die Auswertung erfolgte mittels Messung der LDH-Konzentration im Zellkulturmedium, einer anerkannten Methode zur Untersuchung der Toxizität in Zellkulturen, sowie durch Zählung der vitalen und apoptotischen Zellen im Anschluss an die Fixierung der Zellen und Färbung der Kerne mittels DAPI. Die Auszählung und Unterteilung in vitale Zellen und apoptotische Zellen orientierte sich dabei an den Empfehlungen des Nomenklatur-Komitees zum Zelltod (Kroemer et al., 2009). Da die Aktivierung der Autophagie also protektiv wirkte, wurde noch der Einfluss des Autophagie-Inhibitors Chloroquin untersucht. Korrespondierend zeigte sich eine Zunahme der Toxizität unter Hinzugabe von Chloroquin.

Diese Ergebnisse sind insbesondere im Einklang mit der Studie von Steele und Kollegen, in welcher im Zellkulturmodell eine Autophagie-Aktivierung vor Alpha-Synuklein-induziertem Zelltod schützte (Steele et al., 2013). Zudem zeigten Mäuse in einem Parkinson-Krankheit-Mausmodell, welches ebenfalls auf einer Alpha-Synuklein-Überexpression basierte, ein verbessertes motorisches Verhalten nach dem Abbau von Alpha-Synuklein mittels Autophagie (Hebron et al., 2013). Den hier präsentierten positiven Effekten der Autophagie-Aktivierung entgegen stehen unter anderem die Studien von Li und Kollegen sowie Choubey und Kollegen

(Choubey et al., 2011; Li et al., 2011). In beiden Fällen können aber die unterschiedlichen experimentellen Bedingungen als Erklärungsansatz für die gegensätzlichen Ergebnisse dienen: In der einen Studie beruhte das Parkinson-Krankheit-Modell auf der Überexpression der A53T-Mutante von Alpha-Synuklein (Choubey et al., 2011). Die A53T-Mutante hat aber einen anderen Einfluss auf die Autophagie als der Alpha-Synuklein-Wildtyp, sodass auch bei Beeinflussung der Autophagie durch Aktivatoren oder Inhibitoren entgegengesetzte Effekte vorstellbar sind (Winslow et al., 2010). In der Studie von Li und Kollegen wurde die Parkinson-Krankheit *in vivo* durch die Gabe von 6-Hydroxydopamin modelliert (Li et al., 2011). Dass sich die Manipulation der Autophagie in einem Neurotoxin-Modell im Vergleich zu einem Modell, das auf der Überexpression von Alpha-Synuklein beruht, unterschiedlich auswirkt, erscheint ebenfalls einleuchtend.

Zusammenfassend konnte in einem neuen Parkinson-Krankheit-Zellmodell mittels Autophagie-Aktivierung vor Alpha-Synuklein-induziertem Zelltod geschützt werden; dies unterstützt die These, dass Autophagie-Aktivierung einen möglichen Ansatz in der Parkinson-Krankheit-Therapie darstellt. Als typisches Neuroleptikum wirkt Trifluoperazin allerdings hemmend an Dopamin-Rezeptoren vom Subtyp D₂ (Marques et al., 2004). Eine Hemmung an D₂-Dopamin-Rezeptoren bewirkt extrapyramidalmotorische Nebenwirkungen und führt zu einer Verschlechterung der Parkinson-Symptomatik (Marques et al., 2004), sodass Trifluoperazin selbst als Therapeutikum der Parkinson-Krankheit nicht in Frage kommt.

Zu der zweiten Frage, ob Alpha-Synuklein durch Autophagie abgebaut wird, und falls ja, welche Alpha-Synuklein-Form durch Autophagie in welchem Ausmaß abgebaut wird:

Es gibt eine Vielzahl an Studien, die sich mit dem Abbau von Alpha-Synuklein beschäftigen. Insbesondere in früheren Arbeiten wurde berichtet, dass das Ubiquitin-Proteasom-System eine entscheidende Rolle beim Abbau von Alpha-Synuklein spielt (Bennett et al., 1999; Tofaris et al., 2001). Dem widersprechend wurde allerdings in nachfolgenden Studien keine Veränderung der Alpha-Synuklein-Konzentrationen durch Inhibition des proteasomalen Abbaus beobachtet (Ancolio et al., 2000; Paxinou et al., 2001; Rideout et al., 2001). In den letzten Jahren mehren sich die Veröffentlichungen, die den lysosomalen Abbau – vermittelt über die unterschiedlichen Formen der Autophagie – für den Alpha-Synuklein-Abbau verantwortlich machen (Klucken et al., 2012; Lee et al., 2004; Paxinou et al., 2001). In diesen Studien wurde allerdings häufig nur das Alpha-Synuklein-Monomer betrachtet (Cuervo et al., 2004; Ebrahimi-Fakhari et al., 2011; Webb et al., 2003) oder zum Teil wurden die Experimente an isolierten Leber-Lysosomen und nicht im zellulären Umfeld durchgeführt (Cuervo et al., 2004). Aus

diesen zahlreichen Studien kann geschlossen werden, dass eine Beteiligung der Makroautophagie an der Degradation von Alpha-Synuklein wahrscheinlich ist. Wie groß diese Beteiligung ist und – fast noch wichtiger – welche Alpha-Synuklein-Form durch Makroautophagie abgebaut wird, ist aber weiterhin Gegenstand von Diskussionen.

In der vorliegenden Arbeit wurden in einem neuen Parkinson-Krankheit-Zellkulturmodell der Einfluss einer Autophagie-Aktivierung mit Trifluoperazin und der Einfluss einer Autophagie-Blockade mit Chloroquin analysiert. Dazu wurden Western Blots unter den verschiedenen Bedingungen angefertigt, um Veränderungen sämtlicher Alpha-Synuklein-Banden detektieren zu können. Interessanterweise zeigte sich im vorliegenden Parkinson-Krankheit-Zellkulturmodell unter der Behandlung mit Trifluoperazin einzig eine 37-kDa-Alpha-Synuklein-Bande systematisch und reproduzierbar verändert. Diese Bande zeigte eine dosisabhängige Reduktion unter Trifluoperazin-Behandlung, sodass davon auszugehen ist, dass in diesem Zellkulturmodell spezifisch diese Bande mittels Makroautophagie abgebaut wurde. Alle anderen Banden zeigten keine signifikanten Veränderungen – offensichtlich existiert für diese ein alternativer Abbauweg. Zur weiteren Untersuchung des Einflusses der Autophagie auf die Alpha-Synuklein-Banden wurde der bekannte Autophagie-Inhibitor Chloroquin eingesetzt. Passend zu der Reduktion der 37-kDa-Alpha-Synuklein-Bande unter Trifluoperazin-Behandlung, zeigte sich unter diesem Autophagie-Inhibitor eine verstärkte 37-kDa-Alpha-Synuklein-Bande. Somit konnte bestätigt werden, dass in diesem Zellmodell Makroautophagie für den Abbau dieser Bande verantwortlich ist. Diese Ergebnisse sind daher in Übereinstimmung mit einer Studie, die zeigte, dass durch Blockade der lysosomalen Degradation insbesondere Alpha-Synuklein-Oligomere akkumulieren, während sie kaum Veränderungen der Alpha-Synuklein-Monomere beobachteten (Lee et al., 2004).

Als Einschränkung der vorliegenden Ergebnisse könnte genannt werden, dass auch die Expressionsraten von Alpha-Synuklein Einfluss auf die unterschiedlichen Degradationswege haben. Ebrahimi-Fakhari und Kollegen machten folgende Beobachtung: Unter normalen Expressionsraten beobachteten sie den Abbau des Alpha-Synuklein-Monomers über das Ubiquitin-Proteasom-Systems, bei Überexpression dagegen hauptsächlich eine Beteiligung der Autophagie am Abbau des Alpha-Synuklein-Monomers (Ebrahimi-Fakhari et al., 2011). In dem hier verwendeten Modell wurde durch adenovirale Transduktion eine eher moderate Überexpression des Alpha-Synuklein-Wildtyps erreicht – entsprechend eines 4,3 +/- 0,6-fachen Anstiegs der Alpha-Synuklein-Level im Vergleich zu nicht-transduzierten Zellen (Höllerhage, Goebel et al., 2014).

In der vorliegenden Arbeit wurde kein signifikanter Einfluss der Makroautophagie auf den Abbau der Alpha-Synuklein-Monomere gesehen. Dies widerspricht unter anderem der Studie von Steele und Kollegen, welche durch Aktivierung der Makroautophagie eine Reduktion der Alpha-Synuklein-Oligomere als auch der Alpha-Synuklein-Monomer-Bande beobachteten (Steele et al., 2013). Dagegen hatte eine weitere Gruppe, wie in den hier präsentierten Ergebnissen, nur einen minimalen Einfluss der Makroautophagie auf den Alpha-Synuklein-Monomer-Abbau gesehen (Cuervo et al., 2004). Vermutlich können die unterschiedlichen experimentellen Bedingungen als Erklärungsansatz für die zum Teil gegensätzlichen Ergebnisse dienen. Neben der Expressionsrate scheint insbesondere die Verwendung jeweils verschiedenartiger Zelltypen eine entscheidende Rolle zu spielen, da sich auch die Unterarten der Autophagie maßgeblich von Zelltyp zu Zelltyp unterscheiden (Vogiatzi et al., 2008). Dabei ist zu betonen, dass der in der vorliegenden Dissertation verwendete Zelltyp eine große Ähnlichkeit zu den bei der Parkinson-Krankheit am stärksten betroffenen Neuronen der *Substantia nigra pars compacta* besitzt (Lotharius et al., 2005) und somit eine hohe Relevanz der in der vorliegenden Arbeit präsentierten Ergebnisse angenommen werden kann.

Zu der dritten Frage, wie wirkt Alpha-Synuklein selbst auf die Autophagie – aktivierend oder hemmend:

Mehrere Publikationen haben einen Effekt von Alpha-Synuklein auf die Autophagie beobachtet, ob der Alpha-Synuklein-Wildtyp allerdings aktivierend oder hemmend wirkt, darüber herrscht Uneinigkeit (Choubey et al., 2011; Stefanis et al., 2001; Winslow et al., 2010; Xilouri et al., 2009). In dem vorliegenden Zellkulturmodell führte die Überexpression von Alpha-Synuklein zu einer Vermehrung der Autophagosomen – gemessen an der LC3B-II Western-Blot-Bandenstärke. Allerdings führte die Blockade der lysosomalen Degradation der Autophagosomen mittels Chloroquin nur zu einer sehr geringen Intensitätssteigerung der LC3B-II-Bande im Vergleich zu nicht-transduzierten Zellen. Dies spricht dafür, dass die Alpha-Synuklein-Überexpression zu einer Hemmung des Autophagosomen-Umsatzes und somit zu einer Hemmung der Autophagie insgesamt führte. Um auszuschließen, dass jegliche Überexpression eines Proteins zu einer solchen Hemmung der Autophagie in LUHMES-Neuronen führt, wurden als Kontrollen auch Zellen verwendet, die mittels eines adenoviralen Vektors GFP überexprimierten. In diesen Zellen zeigte sich keine wesentliche Veränderung der Autophagie im Vergleich zu nicht-transduzierten Zellen. Dies lässt die Interpretation zu, dass in dem vorliegenden Zellmodell die Überexpression des Alpha-Synuklein-Wildtyps den Umsatz der Autophagosomen stört und somit die Autophagie hemmt (Klionsky et al., 2012;

Rubinsztein et al., 2009). Auch zur Analyse des Einflusses von Alpha-Synuklein auf die Autophagie ist der verwendete Zelltyp von großer Wichtigkeit: In PC12-Zellen und kortikalen Ratten-Neuronen wurde kein Effekt einer Alpha-Synuklein-Wildtyp-Überexpression auf die Autophagie beschrieben, während in differenzierten SH-SY5Y-Zellen eine Erhöhung der LC3B-II-Banden zur Darstellung kam, ohne dass dadurch aber die Degradations-Rate der Makroautophagie beeinflusst wurde (Xilouri et al., 2009). Die Autoren interpretierten ihre Ergebnisse an den differenzierten SH-SY5Y-Zellen mit Erhöhung der LC3B-II-Bande unter Alpha-Synuklein-Wildtyp-Überexpression als Induktion der Autophagie, also entgegen den hier präsentierten Ergebnissen (Xilouri et al., 2009). Wenn aber die Autophagie einen gleich starken Proteinabbau bei insgesamt höherer Autophagosomen-Anzahl bewirkt, könnte man dies ebenfalls im Sinne einer ineffektiveren Autophagie werten, was wiederum gut zu den hier dargestellten Ergebnissen passen würde. In Übereinstimmung zu den in der vorliegenden Arbeit präsentierten Daten zeigten Winslow und Kollegen, dass eine Überexpression von Alpha-Synuklein die Autophagie hemmt (Winslow et al., 2010). In dieser Arbeit war allerdings bereits die Omegasom-Bildung gestört, also die Bildung einer Präautophagosomen-Struktur – nachgewiesen anhand verminderter LC3B-II-Banden. Dies ist ein Unterschied zu den hier präsentierten Western Blots, in welchen eine Intensivierung der LC3B-II-Banden beobachtet wurde.

Die hier präsentierten Ergebnisse sind dafür im Einklang mit Untersuchungen an postmortalen Gehirnen von Parkinson-Krankheit-Patienten, welche eine Erhöhung von Autophagosomen nachwiesen (Anglade et al., 1997), was am ehesten auf eine lysosomale Dysfunktion zurückzuführen ist (Chu et al., 2009). Auch bei Untersuchungen an Gehirnen von DLB-Patienten, ebenso wie die Parkinson-Krankheit eine Synukleinopathie, zeigten sich Erhöhungen von LC3B-II im Vergleich zu Kontrollgehirnen (Yu et al., 2009). Bei Yu und Kollegen wurde daraus eine Aktivierung der Autophagie geschlussfolgert. Diese Interpretation ist so nicht zulässig, da eine Vermehrung an Autophagosomen entweder ein Resultat eines verminderten Autophagosomen-Abbaus oder tatsächlich einer Verstärkung der Autophagie entspricht. In Anbetracht der Tatsache, dass Patienten mit Synukleinopathien lysosomale Dysfunktionen aufweisen, scheint aber – wie im vorliegenden Zellmodell – eine gestörte Autophagie wahrscheinlicher.

Zusammenfassend konnte durch die vorliegenden Ergebnisse gezeigt werden, dass eine Überexpression des Alpha-Synuklein-Wildtyps zu einer Inhibierung der Autophagie in LUHMES-Neuronen führte.

4.2 Zusammenhang zwischen der 37-kDa-Alpha-Synuklein-Bande und der Toxizität

Dass Alpha-Synuklein eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Parkinson-Krankheit spielt, ist – wie in der Einleitung beschrieben – aus vielerlei Gründen unbestritten. Zudem herrscht größtenteils Einigkeit darüber, dass nicht das Alpha-Synuklein-Monomer toxisch wirkt, sondern erst fehlgefaltetes Alpha-Synuklein die neurodegenerative Wirkung entfaltet (Winklhofer et al., 2008). Allerdings ist weiterhin unklar, welche Alpha-Synuklein-Form die Neurodegeneration vermittelt. Der Hauptbestandteil der Lewy-Körperchen besteht aus einer fibrillären Form von Alpha-Synuklein (Fujiwara et al., 2002; Spillantini et al., 1997; Trojanowski and Lee, 2003). Lewy-Körperchen sind allerdings auch in circa 10-15 % von bis zum Ableben neurologisch gesunden, älteren Menschen nachweisbar (Gibb and Lees, 1988). Zudem zeigten Untersuchungen, dass große Alpha-Synuklein-Aggregate auch eine protektive Wirkung entfalten können (Bodner et al., 2006; Garske et al., 2007; Tanaka et al., 2004). Daraus wurde die Hypothese abgeleitet, dass fibrilläre Formen von Alpha-Synuklein nicht die toxischen Formen von Alpha-Synuklein darstellen, sondern die Formierung von Lewy-Körperchen die Zellen schützen soll (Caughey and Lansbury, 2003; Tanaka et al., 2004). Aus dieser Hypothese entstand wiederum die Vermutung, dass fehlgefaltete Alpha-Synuklein-Oligomere die toxische Alpha-Synuklein-Form darstellen (Caughey and Lansbury, 2003; Walsh and Selkoe, 2004). Ohne dass bisher das genaue toxische Alpha-Synuklein-Oligomer bekannt ist, wird die Hypothese der toxischen präfibrillären Alpha-Synuklein-Oligomere in einem Großteil der Publikationen vertreten (Danzer et al., 2007; Karpinar et al., 2009; Villar-Piqué et al., 2016; Winner et al., 2011; Zhang et al., 2008). Dementgegen steht eine Studie von Taschenberger und Kollegen, die wiederum Toxizität durch die fibrilläre Form von Alpha-Synuklein beobachteten (Taschenberger et al., 2012).

In dem hier verwendeten neuen Zellkultumodell der Parkinson-Krankheit führte eine Überexpression des Alpha-Synuklein-Wildtyps zum Auftreten einer oligomerischen 37-kDa-Alpha-Synuklein-Western-Blot-Bande, die in nicht-transduzierten Zellen nicht zu beobachten war. Zudem kam es unter Trifluoperazin-Behandlung zu einer dosisabhängigen Reduktion spezifisch dieser Band. Es zeigte sich eine hochsignifikante positive Korrelation zwischen dieser 37-kDa-Alpha-Synuklein-Bande und der Toxizität in diesem Zellkulturmodell. Dass Trifluoperazin als Aktivator der Autophagie spezifisch zur Reduktion dieser 37-kDa-Bande führte, ist insbesondere deswegen interessant, da aktuell noch keine Einigkeit hinsichtlich der physiologischen Form von Alpha-Synuklein herrscht (Bartels et al., 2011; Binolfi et al., 2012;

Dettmer et al., 2013; Fauvet et al., 2012). Dadurch, dass Trifluoperazin einzig eine Bande reduzierte, die unter pathologischen Bedingungen auftrat, ist kein Einfluss auf physiologische Alpha-Synuklein-Formen zu erwarten. Die Ergebnisse der Trifluoperazin-Experimente konnten durch den Autophagie-Inhibitor Chloroquin bestätigt werden, unter dessen Behandlung eine vermehrte Intensität dieser Bande beobachtet und gleichzeitig auch eine Zunahme der Alpha-Synuklein-induzierten Toxizität gesehen wurde. Diese Ergebnisse sind in Übereinstimmung mit der *In-vivo*-Studie von Winner und Kollegen, in welcher Punktmutationen im Alpha-Synuklein-Gen generiert wurden, die eine erhöhte Neigung zur Oligomerisierung zeigten (Winner et al., 2011). Durch die Überexpression dieser Alpha-Synuklein-Mutanten in der *Substantia nigra* von Ratten konnte eine vermehrte Toxizität erreicht werden und gleichzeitig zeigte sich in Western Blots eine vermehrte Intensität einer circa 37-kDa-Alpha-Synuklein-Bande. In dieser Publikation wird diese Bande als Trimer bezeichnet (Winner et al., 2011). Auch in weiteren Studien zeigten Alpha-Synuklein-Oligomere Toxizität, wobei in diesen Studie nur eine ungefähre Bestimmung der Durchmesser der untersuchten Oligomere erfolgte (Danzer et al., 2007; Karpinar et al., 2009; Zhang et al., 2008).

Das Alpha-Synuklein-Monomer besteht aus 140 Aminosäuren und purifiziertes Alpha-Synuklein hat ein Molekulargewicht von 14,7 kDa (Jakes et al., 1994). In der Erstbenennung von Alpha-Synuklein durch Jakes und Kollegen zeigte es in der SDS-PAGE allerdings ein scheinbares Molekulargewicht von 19 kDa, diese Differenz wurde durch den negativ geladenen Carboxyl-Terminus erklärt (Jakes et al., 1994). In den meisten folgenden Veröffentlichungen wies das Alpha-Synuklein-Monomer in Western Blots allerdings ein Molekulargewicht von 16 oder 17 kDa auf (Jensen et al., 1997; Sharon et al., 2001). In den für diese Arbeit angefertigten Western Blots lag das Molekulargewicht des Monomers ebenfalls bei 16 kDa. Vermutlich handelt es sich somit bei der beobachteten 37-kDa-Western-Blot-Bande nicht um ein einfaches Vielfaches von Alpha-Synuklein-Monomeren. Es ist deswegen unklar, woraus diese 37-kDa-Bande genau besteht und wie sie entsteht. Offensichtlich war diese Bande aber SDS-resistent. Es konnte bereits *in vitro* demonstriert werden, dass Alpha-Synuklein autoproteolytische Fähigkeiten besitzt, was in der Bildung von kleinen Alpha-Synuklein-Fragmenten resultierte, die ein hohes Potential zur Aggregation aufwiesen (Vlad et al., 2011). Die hier beobachtete oligomerische 37-kDa-Alpha-Synuklein-Bande könnte also aus Alpha-Synuklein-Monomeren und Alpha-Synuklein-Fragmenten bestehen. Allerdings konnten keine kleinen Alpha-Synuklein-Fragmente in den hier angefertigten Western Blots beobachtet werden. Möglich wäre zudem, dass es sich bei dieser 37-kDa-Bande um ein Spaltprodukt eines größeren Alpha-Synuklein-Oligomers handelt. Weiterhin kann auch nicht ausgeschlossen werden, dass diese 37-kDa-Bande erst

während der Western-Blot-Prozedur inklusive SDS-Zugabe und Erhitzen aus einem größeren Alpha-Synuklein-Oligomer entsteht oder es sich um einen Proteinkomplex zwischen einem Alpha-Synuklein-Monomer und einem anderen Protein handelt, denn Alpha-Synuklein ist bekannt für das Potential mit anderen Proteinen zu interagieren (Breydo et al., 2012; Uversky, 2011).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die hier vorgestellten Korrelationen zwischen der Toxizität und der Intensität der 37-kDa-Bande zwar kein Beweis, aber zumindest ein starker Hinweis dafür sind, dass diese 37-kDa-Alpha-Synuklein-Bande für die Alpha-Synuklein-induzierte Toxizität in diesem Zellkulturmodell hauptverantwortlich war. Ob diese Alpha-Synuklein Bande auch über dieses Parkinson-Krankheit-Zellkulturmodell hinaus eine Bedeutung für die Pathogenese von Synukleinopathien besitzt, muss weiter erforscht werden.

4.3 Limitationen des verwendeten Zellkulturmodells

Modelle in der medizinischen Forschung sind immer nur Versuche, die zu erforschende Erkrankung möglichst realitätsnah darzustellen. Weder *In-vitro*- noch *In-vivo*-Modelle können die gesamte Heterogenität einer neurodegenerativen Erkrankung abbilden (Franco and Cedazo-Minguez, 2014).

Das hier verwendete Modell ist ein reines Zellkulturmodell mit neuronalen Zellen. Unter physiologischen Bedingungen befinden sich die Neurone im Gehirn aber im Zellverbund mit Gliazellen und Neuronen anderer struktureller Einheiten. Der Einfluss von Gliazellen und interneuronalen Verbindungen zu Neuronen anderer Teile des Gehirns kann in einem isolierten Zellmodell aus Neuronen nicht untersucht werden. Es lässt sich also keine Aussage darüber treffen, wie groß zum Beispiel der Einfluss von Gliazellen bei der Akkumulation oder Entgiftung der verwendeten Substanzen sein könnte. Auch die Zell-zu-Zell-Transmission von Alpha-Synuklein und die Transmission der Alpha-Synuklein-Pathologie werden in einem reinen Zellkulturmodell anders ablaufen als in einem festen Neuronenverband inklusive Gliazellen. Zudem erstreckt sich die Pathogenese einer neurodegenerativen Erkrankung über viele Jahre, wenn nicht sogar Jahrzehnte (Palma and Kaufmann, 2014). Eine Neurodegeneration, die sich innerhalb von sechs Tagen entwickelt, kann also natürlich nicht die volle Komplexität einer solchen Erkrankung abbilden. Dennoch bietet eine Zeitspanne von sechs Tagen zumindest genügend Zeit für pharmakologische Interventionen.

In dem hier verwendeten Zellkulturmodell wurde die Neurodegeneration durch eine moderate Überexpression von Wildtyp-Alpha-Synuklein induziert. Duplikationen und Triplikationen von *SNCA* führen zu einem autosomal-dominant vererbten genetischen Parkinson-Syndrom (Chartier-Harlin et al., 2004; Singleton et al., 2003). Diese Gen-Multiplikationen sind mit einer Zunahme an Alpha-Synuklein-mRNA assoziiert (Miller et al., 2004; siehe auch „Einleitung“). Diese Formen des genetischen Parkinson-Syndroms werden durch die hier herbeigeführte Alpha-Synuklein-Überexpression also recht gut modelliert. Beim idiopathischen Parkinson-Syndrom, der Parkinson-Krankheit, wurde in früheren Arbeiten allerdings angezweifelt, dass der Entstehung der Alpha-Synuklein Aggregation eine Alpha-Synuklein-Überexpression zu Grunde liegt (Kingsbury et al., 2004). In einer aktuelleren Studie wurde der bisher fehlende Nachweis einer erhöhten Alpha-Synuklein-Expression bei Patienten der Parkinson-Krankheit durch eine Diskrepanz der Postmortem-Intervalle erklärt (Dumitriu et al., 2012): Lag das Postmortem-Intervall unter 5,5 Stunden zeigte sich eine signifikant erhöhte *SNCA*-Genexpression in Gehirnen von Parkinson-Patienten im Vergleich zu Kontrollgehirnen; während sich dieses Verhältnis bei einem Postmortem-Intervall von über 10 Stunden umkehrte (Dumitriu et al., 2012). Offensichtlich wird die *SNCA*-mRNA in Gehirnen von Parkinson-Krankheit-Patienten nach dem Ableben schneller abgebaut. Insofern könnte in der Realität tatsächlich eine vermehrte *SNCA*-Expression entscheidend an der Pathogenese der Parkinson-Krankheit beteiligt sein und das verwendete Modell diese gut repräsentieren.

4.4 Schlussfolgerung und Ausblick

Die Entdeckung von Substanzen, die die Krankheitsprogression der Parkinson-Krankheit hinauszögern, ist zentraler Bestandteil der Parkinson-Forschung. Denn weiterhin gibt es keine Medikamente, die die Krankheitsprogression verlangsamen oder gar aufhalten (Worth, 2013). Die Protektion *in vitro* ist dazu der erste Schritt. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, zu untersuchen, ob durch Autophagie-Aktivierung eine Protektion in einem neuen Parkinson-Krankheit-Zellkulturmodell erreicht werden kann. Dieses neue Zellkulturmodell basiert auf der Überexpression des Alpha-Synuklein-Wildtyps. Als neuroprotektive Substanz in diesem Modell wurde in der vorliegenden Arbeit der bekannte Autophagie-Aktivator Trifluoperazin vorgestellt. Es konnte somit bestätigt werden, dass die Autophagie-Aktivierung einen potentiellen Ansatz für eine zukünftige Therapie der Parkinson-Krankheit darstellt. Zudem konnte die Auswirkung der Autophagie auf Alpha-Synuklein beobachtet werden. Dabei zeigte

sich, dass nur eine spezifische 37 kDa große Alpha-Synuklein-Bande durch Autophagie abgebaut wurde, während andere Alpha-Synuklein-Banden durch die Aktivierung der Autophagie unverändert blieben. Weiterhin konnte eine hochsignifikante Beziehung zwischen dieser 37-kDa-Alpha-Synuklein-Bande und der Toxizität innerhalb dieses Modells hergestellt werden. Nach wie vor ist die exakte toxische Alpha-Synuklein-Form unbekannt. Anhand der vorliegenden Arbeit kann aber zumindest vermutet werden, dass die hier beobachtete 37-kDa-Alpha-Synuklein-Bande einen Anteil an der Alpha-Synuklein-vermittelten Toxizität hat. Mittels des Lysosomen-Inhibitors Chloroquin konnte zudem gezeigt werden, dass die Überexpression von Alpha-Synuklein die lysosomale Degradation der Autophagosomen hemmt – auch in diesem Hinblick liefert die präsentierte Arbeit also neue Informationen, denn ob Alpha-Synuklein die Autophagie aktiviert oder hemmt ist bislang umstritten.

Somit konnte eine Reihe relevanter Fragen im Rahmen dieser Arbeit zumindest für das hier vorliegende Zellkulturmodell beantwortet werden. Dennoch verbleiben selbstverständlich wichtige Fragestellungen oder werden sogar durch die Arbeit erst aufgeworfen: Zum Beispiel ist der genaue molekulare Wirkmechanismus durch den die Autophagie-Aktivierung mittels Trifluoperazin erfolgt, ungeklärt. Nach Analyse dieser könnten womöglich spezifischere Autophagie-Aktivatoren entwickelt werden. Anscheinend wird die 37-kDa-Bande in dem hier verwendeten Zellmodell via Makroautophagie abgebaut, aber durch welche Abbauprozesse werden die restlichen Alpha-Synuklein-Banden abgebaut? Wenngleich die hier präsentierten Daten nur eine Korrelation zwischen der 37-kDa-Bande und der Toxizität liefern konnten, sprechen die Daten sehr dafür, dass die 37-kDa-Bande ein entscheidender Baustein in der Pathophysiologie Alpha-Synuklein-vermittelter Toxizität ist. Lohnenswert wäre deswegen eine weitere Charakterisierung der 37-kDa-Alpha-Synuklein-Bande. Im Optimalfall sollte man hierfür versuchen, diese Bande zu isolieren und dann einen direkten Toxizitätsnachweis zu erbringen.

Es konnte hier bestätigt werden, dass Autophagie-Aktivierung einen möglichen Therapieansatz bei der Parkinson-Krankheit darstellt. Aber natürlich ist weiterführende *In-vitro*- und *In-vivo*-Forschung notwendig, denn Trifluoperazin kommt aufgrund seiner antidopaminergen Wirkung nicht als Therapeutikum der Parkinson-Krankheit in Betracht. Es sollten also weitere Autophagie-Aktivatoren identifiziert werden, die in dem vorliegenden Modell protektiv wirken. Anschließend wäre eine Testung *in vivo* wünschenswert und nach der Identifizierung sicherer und protektiver Substanzen könnten Studien an Patienten initiiert werden.

5 Zusammenfassung

5.1 Deutsche Zusammenfassung

Die Parkinson-Erkrankung ist die zweithäufigste neurodegenerative Erkrankung nach der Alzheimer-Demenz. In industrialisierten Ländern liegt die Prävalenz der Erkrankung bei knapp zwei Prozent für alle Personen über 65 Jahren.

Klinisch ist die Erkrankung charakterisiert durch Bradykinese, Rigor, Ruhetremor und posturale Instabilität. Diese motorischen Symptome sind hauptsächlich durch einen Verlust dopaminerger Neurone in der *Substantia nigra pars compacta* verursacht. Das histopathologische Kennzeichen der Parkinson-Krankheit ist die Präsenz von intraneuronalen Einschlüssen, sogenannten Lewy-Körperchen, in überlebenden Neuronen der *Substantia nigra pars compacta*. Die Hauptkomponente der Lewy-Körperchen ist Alpha-Synuklein, ein Protein bestehend aus 140 Aminosäuren. Sinnverändernde Mutationen, Duplikationen und Triplikationen des Alpha-Synuklein-Gens führen zu seltenen genetischen Parkinson-Syndromen. Zudem haben genomweite Assoziationsstudien eine Vielzahl an Risikogenvarianten des Alpha-Synuklein-Gens als Risikofaktor für die Parkinson-Krankheit identifiziert. Aus diesen Gründen ist es heutzutage unbestritten, dass Alpha-Synuklein eine zentrale Rolle in der Entstehung der Parkinson-Krankheit spielt; allerdings ist weiterhin unklar, welche Alpha-Synuklein-Form die Neurodegeneration vermittelt. Bislang lindert die pharmakologische Therapie lediglich die Symptome der Parkinson-Krankheit und es existiert keine Therapie, die die Progression der Erkrankung nachweisbar verzögert oder gar aufhält.

In unserer Forschungsgruppe wurde ein neues Zellkulturmodell der Parkinson-Krankheit entwickelt, in welchem die Überexpression des Alpha-Synuklein-Wildtyps durch adenovirale Transduktion zum Zelltod von humanen, postmitotischen, dopaminergen Neuronen (LUHMES-Zellen) führt.

Ein Prozess der zellulären Homöostase um pathologische intrazelluläre Einschlüsse abzubauen, ist die Makroautophagie. Ziel dieser Dissertation war es deswegen zu untersuchen, ob Trifluoperazin, ein bekannter Aktivator der Makroautophagie in Neuronen, dopaminerge Zellen vor Wildtyp-Alpha-Synuklein-induzierter Toxizität schützen kann.

Zunächst wurde durch Western-Blot-Analysen gezeigt, dass Trifluoperazin Makroautophagie auch in den hier verwendeten LUHMES-Neuronen aktiviert. Anschließend konnte nachgewiesen werden, dass diese Substanz tatsächlich die Zellen dosisabhängig vor Alpha-Synuklein-vermitteltem Zelltod schützt. Die dazu verwendeten Auswertungsmethoden

umfassten die Messung der LDH-Konzentration im Zellkulturmedium sowie das Auszählen vitaler Zellen und apoptotischer Zellen nach der Zellfixierung und Färbung mittels DAPI.

Die Überexpression von Wildtyp-Alpha-Synuklein führte zusätzlich zur Toxizität auch zum Erscheinen einer 37-kDa-Alpha-Synuklein-Western-Blot-Bande, welche in nicht-transduzierten Zellen nicht nachweisbar war. Interessanterweise konnte die Intensität dieser 37-kDa-Alpha-Synuklein-Bande durch Behandlung mit Trifluoperazin spezifisch und dosisabhängig reduziert werden, ohne die restlichen Alpha-Synuklein-Banden signifikant zu verändern. Chloroquin, ein Inhibitor der Autophagie, verstärkte passend dazu sowohl die Alpha-Synuklein-induzierte Toxizität als auch die 37-kDa-Alpha-Synuklein-Bande. Es ergab sich eine signifikante positive Korrelation zwischen der Toxizität und der Stärke dieser Western-Blot-Bande. Diese Daten legen den Schluss nahe, dass diese oligomerische Alpha-Synuklein-Bande eine Schlüsselrolle in der Alpha-Synuklein-vermittelten Toxizität zumindest innerhalb dieses Zellkulturmodells der Parkinson-Krankheit einnimmt.

Der eigene Einfluss von Alpha-Synuklein auf die Makroautophagie (aktivierend oder hemmend) ist nach wie vor nicht vollständig geklärt. Die Ergebnisse der in dieser Dissertation durchgeführten Experimente lassen die Interpretation zu, dass eine Überexpression des Alpha-Synuklein-Wildtyps die Makroautophagie hemmt.

Die Kernaussage dieser Doktorarbeit ist, dass die Aktivierung der Autophagie humane, postmitotische, dopaminerge Zellen vor Wildtyp-Alpha-Synuklein-induzierter Toxizität durch Abbau einer spezifischen Alpha-Synuklein-Form schützt. Diese Ergebnisse unterstützen die These, dass Autophagie-Aktivierung einen möglichen Ansatz in der Therapie der Parkinson-Krankheit darstellt. Zudem wurde eine 37-kDa-Alpha-Synuklein-Bande mittels Western Blot identifiziert, welche womöglich auch in der Pathogenese der Parkinson-Krankheit eine Rolle spielt.

5.2 Englische Zusammenfassung

Parkinson's disease is the second most common neurodegenerative disease after Alzheimer's disease and affects nearly two percent of all people aged 65 or older in industrialized countries. Clinically it is characterized by bradykinesia, rigidity, tremor, and postural instability. These motor symptoms are mainly caused by the demise of dopaminergic neurons in the *substantia nigra pars compacta*. The histopathological hallmark of Parkinson's disease is the presence of intracellular protein inclusions, called Lewy bodies, in cells of the *substantia nigra*

pars compacta. The main component of Lewy bodies is alpha-synuclein, a 140 amino acids long protein. Missense mutations, duplications or triplications of the alpha-synuclein gene (*SNCA*) lead to rare familial forms of Parkinson's disease. Moreover, genome-wide-association studies identified variants of *SNCA* as risk factors for sporadic Parkinson's disease. For these reasons it is undisputed, that alpha-synuclein plays a major role in the development of Parkinson's disease. However, so far the precise alpha-synuclein species responsible for neuronal death is controversially debated. To date, pharmacological therapies of Parkinson's disease are only symptomatic and there is no known therapy that halts or slows the progression of the disease. In our research group a new cell culture model of Parkinson's disease was developed, in which adenoviral overexpression of wild-type alpha-synuclein leads to cell death in human postmitotic dopaminergic neurons (LUHMES cells).

One cellular mechanism to dispose unwanted protein inclusions is macroautophagy. Therefore, the goal of this dissertation was to investigate if trifluoperazine, a known enhancer of macroautophagy in neurons, protects these dopaminergic cells from alpha-synuclein-mediated toxicity.

First of all, Western blot analysis was used to show that trifluoperazine activated macroautophagy in LUHMES neurons. Then it could be proven that treatment with this compound protected LUHMES cells from alpha-synuclein-induced cell death in a concentration-dependent manner. The readout methods to measure cell death or survival comprised release of LDH into the cell culture medium as well as cell count after nuclear staining with DAPI.

Besides toxicity, overexpression of alpha-synuclein in this cell model led to the appearance of a small oligomeric band of alpha-synuclein with a molecular weight of 37 kDa, which was not present in untransduced cells. Trifluoperazine reduced specifically this 37 kDa alpha-synuclein Western blot band in a dose-dependent manner without altering other alpha-synuclein bands. Inversely, inhibition of autophagy by chloroquine, a known inhibitor of autophagy, increased the toxicity of alpha-synuclein and this 37 kDa band, too. There was a significant positive correlation between toxicity and the strength of this band. These data strongly suggest that this 37 kDa band is a key form implicated in the toxicity of alpha-synuclein at least in our cell model of Parkinson's disease.

Additionally, from the experiments in this dissertation it can be concluded that overexpression of alpha-synuclein inhibits macroautophagy – the impact of alpha-synuclein itself on autophagy is so far a heavily debated question, too.

In summary, it was shown that enhancement of autophagy saved human dopaminergic cells from alpha-synuclein-induced toxicity by degradation of a specific alpha-synuclein species only seen under pathological conditions. This suggests that activation of autophagy might be a possible target for a disease modifying pharmacotherapy for Parkinson's disease in the future. Furthermore, a 37 kDa alpha-synuclein band was seen, which might be a key toxic species in Parkinson's disease.

6 Literaturverzeichnis

Abeliovich, A., Schmitz, Y., Fariñas, I., Choi-Lundberg, D., Ho, W.H., Castillo, P.E., Shinsky, N., Verdugo, J.M., Armanini, M., Ryan, A., et al. (2000). Mice lacking alpha-synuclein display functional deficits in the nigrostriatal dopamine system. *Neuron* 25, 239–252.

Ahn, K.J., Paik, S.R., Chung, K.C., and Kim, J. (2006). Amino acid sequence motifs and mechanistic features of the membrane translocation of alpha-synuclein. *J. Neurochem.* 97, 265–279.

Alegre-Abarrategui, J., Christian, H., Lufino, M.M.P., Mutihac, R., Venda, L.L., Ansorge, O., and Wade-Martins, R. (2009). LRRK2 regulates autophagic activity and localizes to specific membrane microdomains in a novel human genomic reporter cellular model. *Hum. Mol. Genet.* 18, 4022–4034.

Ancolio, K., Alves da Costa, C., Uéda, K., and Checler, F. (2000). Alpha-synuclein and the Parkinson's disease-related mutant Ala53Thr-alpha-synuclein do not undergo proteasomal degradation in HEK293 and neuronal cells. *Neurosci. Lett.* 285, 79–82.

Anglade, P., Vyas, S., Javoy-Agid, F., Herrero, M.T., Michel, P.P., Marquez, J., Mouatt-Prigent, A., Ruberg, M., Hirsch, E.C., and Agid, Y. (1997). Apoptosis and autophagy in nigral neurons of patients with Parkinson's disease. *Histol. Histopathol.* 12, 25–31.

Appel-Cresswell, S., Vilarino-Guell, C., Encarnacion, M., Sherman, H., Yu, I., Shah, B., Weir, D., Thompson, C., Szu-Tu, C., Trinh, J., et al. (2013). Alpha-synuclein p.H50Q, a novel pathogenic mutation for Parkinson's disease. *Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc.* 28, 811–813.

Ballard, P.A., Tetrad, J.W., and Langston, J.W. (1985). Permanent human parkinsonism due to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP): seven cases. *Neurology* 35, 949–956.

Bandyopadhyay, U., Bandhyopadhyay, U., and Cuervo, A.M. (2007). Chaperone-mediated autophagy in aging and neurodegeneration: lessons from alpha-synuclein. *Exp. Gerontol.* 42, 120–128.

Barbour, R., Kling, K., Anderson, J.P., Banducci, K., Cole, T., Diep, L., Fox, M., Goldstein, J.M., Soriano, F., Seubert, P., et al. (2008). Red blood cells are the major source of alpha-synuclein in blood. *Neurodegener. Dis.* 5, 55–59.

Bartels, T., Choi, J.G., and Selkoe, D.J. (2011). α -Synuclein occurs physiologically as a helically folded tetramer that resists aggregation. *Nature* 477, 107–110.

Barth, S., Glick, D., and Macleod, K.F. (2010). Autophagy: assays and artifacts. *J. Pathol.* 221, 117–124.

Beach, T.G., Adler, C.H., Lue, L., Sue, L.I., Bachalakuri, J., Henry-Watson, J., Sasse, J., Boyer, S., Shirohi, S., Brooks, R., et al. (2009). Unified staging system for Lewy body disorders: correlation with nigrostriatal degeneration, cognitive impairment and motor dysfunction. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 117, 613–634.

- Beekes, M., Thomzig, A., Schulz-Schaeffer, W.J., and Burger, R. (2014). Is there a risk of prion-like disease transmission by Alzheimer- or Parkinson-associated protein particles? *Acta Neuropathol. (Berl.)* 128, 463–476.
- Bendor, J.T., Logan, T.P., and Edwards, R.H. (2013). The function of α -synuclein. *Neuron* 79, 1044–1066.
- Bennett, M.C., Bishop, J.F., Leng, Y., Chock, P.B., Chase, T.N., and Mouradian, M.M. (1999). Degradation of alpha-synuclein by proteasome. *J. Biol. Chem.* 274, 33855–33858.
- Bernheimer, H., Birkmayer, W., Hornykiewicz, O., Jellinger, K., and Seitelberger, F. (1973). Brain dopamine and the syndromes of Parkinson and Huntington. Clinical, morphological and neurochemical correlations. *J. Neurol. Sci.* 20, 415–455.
- BETHLEM, J., and DEN HARTOG JAGER, W.A. (1960). The incidence and characteristics of Lewy bodies in idiopathic paralysis agitans (Parkinson's disease). *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 23, 74–80.
- Beyer, K. (2006). Alpha-synuclein structure, posttranslational modification and alternative splicing as aggregation enhancers. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 112, 237–251.
- Binolfi, A., Theillet, F.-X., and Selenko, P. (2012). Bacterial in-cell NMR of human α -synuclein: a disordered monomer by nature? *Biochem. Soc. Trans.* 40, 950–954.
- Blandini, F., Nappi, G., Tassorelli, C., and Martignoni, E. (2000). Functional changes of the basal ganglia circuitry in Parkinson's disease. *Prog. Neurobiol.* 62, 63–88.
- Bloch, A., Probst, A., Bissig, H., Adams, H., and Tolnay, M. (2006). Alpha-synuclein pathology of the spinal and peripheral autonomic nervous system in neurologically unimpaired elderly subjects. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 32, 284–295.
- Bodner, R.A., Outeiro, T.F., Altmann, S., Maxwell, M.M., Cho, S.H., Hyman, B.T., McLean, P.J., Young, A.B., Housman, D.E., and Kazantsev, A.G. (2006). Pharmacological promotion of inclusion formation: A therapeutic approach for Huntington's and Parkinson's diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 4246–4251.
- Boeve, B.F. (2010). REM sleep behavior disorder: Updated review of the core features, the REM sleep behavior disorder-neurodegenerative disease association, evolving concepts, controversies, and future directions. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1184, 15–54.
- Bower, J.H., Maraganore, D.M., McDonnell, S.K., and Rocca, W.A. (2000). Influence of strict, intermediate, and broad diagnostic criteria on the age- and sex-specific incidence of Parkinson's disease. *Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc.* 15, 819–825.
- Braak, H., and Del Tredici, K. (2009). Neuroanatomy and pathology of sporadic Parkinson's disease. *Adv. Anat. Embryol. Cell Biol.* 201, 1–119.
- Braak, H., Del Tredici, K., Rüb, U., de Vos, R.A.I., Jansen Steur, E.N.H., and Braak, E. (2003). Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol. Aging* 24, 197–211.

- Braak, H., Ghebremedhin, E., Rüb, U., Bratzke, H., and Del Tredici, K. (2004). Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology. *Cell Tissue Res.* 318, 121–134.
- Braak, H., de Vos, R.A.I., Bohl, J., and Del Tredici, K. (2006). Gastric alpha-synuclein immunoreactive inclusions in Meissner's and Auerbach's plexuses in cases staged for Parkinson's disease-related brain pathology. *Neurosci. Lett.* 396, 67–72.
- Breydo, L., Wu, J.W., and Uversky, V.N. (2012). A-synuclein misfolding and Parkinson's disease. *Biochim. Biophys. Acta* 1822, 261–285.
- Burré, J., Sharma, M., Tsetsenis, T., Buchman, V., Etherton, M.R., and Südhof, T.C. (2010). Alpha-synuclein promotes SNARE-complex assembly in vivo and in vitro. *Science* 329, 1663–1667.
- Caughey, B., and Lansbury, P.T. (2003). Protofibrils, pores, fibrils, and neurodegeneration: separating the responsible protein aggregates from the innocent bystanders. *Annu. Rev. Neurosci.* 26, 267–298.
- Cedarbaum, J.M., and McDowell, F.H. (1987). Sixteen-year follow-up of 100 patients begun on levodopa in 1968: emerging problems. *Adv. Neurol.* 45, 469–472.
- Chandra, S., Gallardo, G., Fernández-Chacón, R., Schlüter, O.M., and Südhof, T.C. (2005). Alpha-synuclein cooperates with CSPalpha in preventing neurodegeneration. *Cell* 123, 383–396.
- Chartier-Harlin, M.-C., Kachergus, J., Roumier, C., Mouroux, V., Douay, X., Lincoln, S., Levecque, C., Larvor, L., Andrieux, J., Hulihan, M., et al. (2004). Alpha-synuclein locus duplication as a cause of familial Parkinson's disease. *Lancet* 364, 1167–1169.
- Cherra, S.J. 3rd, and Chu, C.T. (2008). Autophagy in neuroprotection and neurodegeneration: A question of balance. *Future Neurol.* 3, 309–323.
- Choubey, V., Safiulina, D., Vaarmann, A., Cagalinec, M., Wareski, P., Kuum, M., Zharkovsky, A., and Kaasik, A. (2011). Mutant A53T alpha-synuclein induces neuronal death by increasing mitochondrial autophagy. *J. Biol. Chem.* 286, 10814–10824.
- Chu, Y., Dodiya, H., Aebischer, P., Olanow, C.W., and Kordower, J.H. (2009). Alterations in lysosomal and proteasomal markers in Parkinson's disease: relationship to alpha-synuclein inclusions. *Neurobiol. Dis.* 35, 385–398.
- Claassen, D.O., Josephs, K.A., Ahlskog, J.E., Silber, M.H., Tippmann-Peikert, M., and Boeve, B.F. (2010). REM sleep behavior disorder preceding other aspects of synucleinopathies by up to half a century. *Neurology* 75, 494–499.
- Conway, K.A., Lee, S.J., Rochet, J.C., Ding, T.T., Williamson, R.E., and Lansbury, P.T. (2000). Acceleration of oligomerization, not fibrillization, is a shared property of both alpha-synuclein mutations linked to early-onset Parkinson's disease: implications for pathogenesis and therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 571–576.
- Cooper, A.A., Gitler, A.D., Cashikar, A., Haynes, C.M., Hill, K.J., Bhullar, B., Liu, K., Xu, K., Strathearn, K.E., Liu, F., et al. (2006). Alpha-synuclein blocks ER-Golgi traffic and Rab1 rescues neuron loss in Parkinson's models. *Science* 313, 324–328.

- Cuervo, A.M., Stefanis, L., Fredenburg, R., Lansbury, P.T., and Sulzer, D. (2004). Impaired degradation of mutant alpha-synuclein by chaperone-mediated autophagy. *Science* 305, 1292–1295.
- Cufí, S., Vazquez-Martin, A., Oliveras-Ferraro, C., Corominas-Faja, B., Cuyàs, E., López-Bonet, E., Martin-Castillo, B., Joven, J., and Menendez, J.A. (2013). The anti-malarial chloroquine overcomes Primary resistance and restores sensitivity to Trastuzumab in HER2-positive breast cancer. *Sci. Rep.* 3.
- Dadakhujiev, S., Noh, H.S., Jung, E.J., Cha, J.Y., Baek, S.M., Ha, J.H., and Kim, D.R. (2010). Autophagy protects the rotenone-induced cell death in alpha-synuclein overexpressing SH-SY5Y cells. *Neurosci. Lett.* 472, 47–52.
- Damier, P., Hirsch, E.C., Agid, Y., and Graybiel, A.M. (1999). The substantia nigra of the human brain. II. Patterns of loss of dopamine-containing neurons in Parkinson's disease. *Brain J. Neurol.* 122 (Pt 8), 1437–1448.
- Danzer, K.M., Haasen, D., Karow, A.R., Moussaud, S., Habeck, M., Giese, A., Kretzschmar, H., Hengerer, B., and Kostka, M. (2007). Different species of alpha-synuclein oligomers induce calcium influx and seeding. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 27, 9220–9232.
- Davidson, W.S., Jonas, A., Clayton, D.F., and George, J.M. (1998). Stabilization of alpha-synuclein secondary structure upon binding to synthetic membranes. *J. Biol. Chem.* 273, 9443–9449.
- de Lau, L.M.L., and Breteler, M.M.B. (2006). Epidemiology of Parkinson's disease. *Lancet Neurol.* 5, 525–535.
- de Rijk, M.C., Tzourio, C., Breteler, M.M., Dartigues, J.F., Amaducci, L., Lopez-Pousa, S., Manubens-Bertran, J.M., Alperovitch, A., and Rocca, W.A. (1997). Prevalence of parkinsonism and Parkinson's disease in Europe: the EUROPARKINSON Collaborative Study. European Community Concerted Action on the Epidemiology of Parkinson's disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 62, 10–15.
- de Rijk, M.C., Launer, L.J., Berger, K., Breteler, M.M., Dartigues, J.F., Baldereschi, M., Fratiglioni, L., Lobo, A., Martinez-Lage, J., Trenkwalder, C., et al. (2000). Prevalence of Parkinson's disease in Europe: A collaborative study of population-based cohorts. Neurologic Diseases in the Elderly Research Group. *Neurology* 54, S21-23.
- Decker, T., and Lohmann-Matthes, M.L. (1988). A quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity. *J. Immunol. Methods* 115, 61–69.
- Deleersnijder, A., Gerard, M., Debyser, Z., and Baekelandt, V. (2013). The remarkable conformational plasticity of alpha-synuclein: blessing or curse? *Trends Mol. Med.* 19, 368–377.
- Deleidi, M., and Gasser, T. (2013). The role of inflammation in sporadic and familial Parkinson's disease. *Cell. Mol. Life Sci.* 70, 4259–4273.

- DelleDonne, A., Klos, K.J., Fujishiro, H., Ahmed, Z., Parisi, J.E., Josephs, K.A., Frigerio, R., Burnett, M., Wszolek, Z.K., Uitti, R.J., et al. (2008). Incidental Lewy body disease and preclinical Parkinson disease. *Arch. Neurol.* 65, 1074–1080.
- Desplats, P., Lee, H.-J., Bae, E.-J., Patrick, C., Rockenstein, E., Crews, L., Spencer, B., Masliah, E., and Lee, S.-J. (2009). Inclusion formation and neuronal cell death through neuron-to-neuron transmission of alpha-synuclein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 13010–13015.
- Deter, R.L., and De Duve, C. (1967). Influence of glucagon, an inducer of cellular autophagy, on some physical properties of rat liver lysosomes. *J. Cell Biol.* 33, 437–449.
- Deter, R.L., Baudhuin, P., and De Duve, C. (1967). Participation of lysosomes in cellular autophagy induced in rat liver by glucagon. *J. Cell Biol.* 35, C11-16.
- Dettmer, U., Newman, A.J., Luth, E.S., Bartels, T., and Selkoe, D. (2013). In vivo cross-linking reveals principally oligomeric forms of α -synuclein and β -synuclein in neurons and non-neural cells. *J. Biol. Chem.* 288, 6371–6385.
- Deuschl, G., Schade-Brittinger, C., Krack, P., Volkmann, J., Schäfer, H., Bötzel, K., Daniels, C., Deuschländer, A., Dillmann, U., Eisner, W., et al. (2006). A randomized trial of deep-brain stimulation for Parkinson's disease. *N. Engl. J. Med.* 355, 896–908.
- Deutsche Gesellschaft für Neurologie (2016). S3-Leitlinie Idiopathisches Parkinson-Syndrom.
- Deutsche Gesellschaft für Neurologie (2012). Parkinson-Syndrome – Diagnostik und Therapie, S2k Leitlinie.
- Dexter, D.T., Carayon, A., Javoy-Agid, F., Agid, Y., Wells, F.R., Daniel, S.E., Lees, A.J., Jenner, P., and Marsden, C.D. (1991). Alterations in the levels of iron, ferritin and other trace metals in Parkinson's disease and other neurodegenerative diseases affecting the basal ganglia. *Brain J. Neurol.* 114 (Pt 4), 1953–1975.
- Dickson, D.W. (2012). Parkinson's disease and parkinsonism: neuropathology. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2.
- Dickson, D.W., Fujishiro, H., DelleDonne, A., Menke, J., Ahmed, Z., Klos, K.J., Josephs, K.A., Frigerio, R., Burnett, M., Parisi, J.E., et al. (2008). Evidence that incidental Lewy body disease is pre-symptomatic Parkinson's disease. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 115, 437–444.
- Dickson, D.W., Braak, H., Duda, J.E., Duyckaerts, C., Gasser, T., Halliday, G.M., Hardy, J., Leverenz, J.B., Del Tredici, K., Wszolek, Z.K., et al. (2009a). Neuropathological assessment of Parkinson's disease: refining the diagnostic criteria. *Lancet Neurol.* 8, 1150–1157.
- Dickson, D.W., Fujishiro, H., Orr, C., DelleDonne, A., Josephs, K.A., Frigerio, R., Burnett, M., Parisi, J.E., Klos, K.J., and Ahlskog, J.E. (2009b). Neuropathology of non-motor features of Parkinson disease. *Parkinsonism Relat. Disord.* 15 Suppl 3, S1-5.
- Doty, R.L., Bromley, S.M., and Stern, M.B. (1995). Olfactory testing as an aid in the diagnosis of Parkinson's disease: development of optimal discrimination criteria. *Neurodegener. J. Neurodegener. Disord. Neuroprotection Neuroregeneration* 4, 93–97.

- Duffy, P., and Tennyson, V. (1965). Phase and electron microscopic observations of Lewy bodies and melanin granules in the substantia nigra and locus caeruleus in Parkinson's disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 398–414.
- Dumitriu, A., Moser, C., Hadzi, T.C., Williamson, S.L., Pacheco, C.D., Hendricks, A.E., Latourelle, J.C., Wilk, J.B., Destefano, A.L., and Myers, R.H. (2012). Postmortem Interval Influences α -Synuclein Expression in Parkinson Disease Brain. *Park. Dis.* 2012, 614212.
- Ebrahimi-Fakhari, D., Cantuti-Castelvetri, I., Fan, Z., Rockenstein, E., Masliah, E., Hyman, B.T., McLean, P.J., and Unni, V.K. (2011). Distinct roles in vivo for the ubiquitin-proteasome system and the autophagy-lysosomal pathway in the degradation of α -synuclein. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 31, 14508–14520.
- Edwards, T.L., Scott, W.K., Almonte, C., Burt, A., Powell, E.H., Beecham, G.W., Wang, L., Züchner, S., Konidari, I., Wang, G., et al. (2010). Genome-wide association study confirms SNPs in SNCA and the MAPT region as common risk factors for Parkinson disease. *Ann. Hum. Genet.* 74, 97–109.
- EHRINGER, H., and HORNYKIEWICZ, O. (1960). [Distribution of noradrenaline and dopamine (3-hydroxytyramine) in the human brain and their behavior in diseases of the extrapyramidal system]. *Klin. Wochenschr.* 38, 1236–1239.
- Emre, M. (2003). Dementia associated with Parkinson's disease. *Lancet Neurol.* 2, 229–237.
- Engelholm, M., and Gasser, T. (2013). Parkinson's disease: is it all in the genes? *Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc.* 28, 1027–1029.
- Fahn, S., Oakes, D., Shoulson, I., Kieburtz, K., Rudolph, A., Lang, A., Olanow, C.W., Tanner, C., Marek, K., and Parkinson Study Group (2004). Levodopa and the progression of Parkinson's disease. *N. Engl. J. Med.* 351, 2498–2508.
- Farrer, M., Kachergus, J., Forno, L., Lincoln, S., Wang, D.-S., Hulihan, M., Maraganore, D., Gwinn-Hardy, K., Wszolek, Z., Dickson, D., et al. (2004). Comparison of kindreds with parkinsonism and alpha-synuclein genomic multiplications. *Ann. Neurol.* 55, 174–179.
- Fauvet, B., Mbefo, M.K., Fares, M.-B., Desobry, C., Michael, S., Ardah, M.T., Tsika, E., Coune, P., Prudent, M., Lion, N., et al. (2012). α -Synuclein in central nervous system and from erythrocytes, mammalian cells, and *Escherichia coli* exists predominantly as disordered monomer. *J. Biol. Chem.* 287, 15345–15364.
- Fearnley, J.M., and Lees, A.J. (1991). Ageing and Parkinson's disease: substantia nigra regional selectivity. *Brain J. Neurol.* 114 (Pt 5), 2283–2301.
- Ferris, C.F., Marella, M., Smerkers, B., Barchet, T.M., Gershman, B., Matsuno-Yagi, A., and Yagi, T. (2013). A phenotypic model recapitulating the neuropathology of Parkinson's disease. *Brain Behav.* 3, 351–366.
- Fily, F., Haegelen, C., Tattevin, P., Buffet-Bataillon, S., Revest, M., Cady, A., and Michelet, C. (2011). Deep brain stimulation hardware-related infections: a report of 12 cases and review of the literature. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 52, 1020–1023.

Foix, C., and Nicolesco, J. (1925). Anatomie cérébrale. Les noyaux gris centraux et la région Mésencéphalo-sous-optique. Suivi d'un appendice sur l'anatomie pathologique de la maladie de Parkinson. Paris: Masson et Cie 508–39.

Franco, R., and Cedazo-Minguez, A. (2014). Successful therapies for Alzheimer's disease: why so many in animal models and none in humans? *Front. Pharmacol.* 5, 146.

Fujiwara, H., Hasegawa, M., Dohmae, N., Kawashima, A., Masliah, E., Goldberg, M.S., Shen, J., Takio, K., and Iwatsubo, T. (2002). alpha-Synuclein is phosphorylated in synucleinopathy lesions. *Nat. Cell Biol.* 4, 160–164.

Garske, A.L., Smith, B.C., and Denu, J.M. (2007). Linking SIRT2 to Parkinson's disease. *ACS Chem. Biol.* 2, 529–532.

Gasser, T. (2009). Mendelian forms of Parkinson's disease. *Biochim. Biophys. Acta* 1792, 587–596.

Gasser, T., Hardy, J., and Mizuno, Y. (2011). Milestones in PD genetics. *Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc.* 26, 1042–1048.

George, J.M., Jin, H., Woods, W.S., and Clayton, D.F. (1995). Characterization of a novel protein regulated during the critical period for song learning in the zebra finch. *Neuron* 15, 361–372.

Giasson, B.I., Duda, J.E., Murray, I.V., Chen, Q., Souza, J.M., Hurtig, H.I., Ischiropoulos, H., Trojanowski, J.Q., and Lee, V.M. (2000). Oxidative damage linked to neurodegeneration by selective alpha-synuclein nitration in synucleinopathy lesions. *Science* 290, 985–989.

Giasson, B.I., Murray, I.V., Trojanowski, J.Q., and Lee, V.M. (2001). A hydrophobic stretch of 12 amino acid residues in the middle of alpha-synuclein is essential for filament assembly. *J. Biol. Chem.* 276, 2380–2386.

Gibb, W.R., and Lees, A.J. (1988). The relevance of the Lewy body to the pathogenesis of idiopathic Parkinson's disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 51, 745–752.

Goldman, S.M., Tanner, C.M., Oakes, D., Bhudhikanok, G.S., Gupta, A., and Langston, J.W. (2006). Head injury and Parkinson's disease risk in twins. *Ann. Neurol.* 60, 65–72.

Good, P.F., Hsu, A., Werner, P., Perl, D.P., and Olanow, C.W. (1998). Protein nitration in Parkinson's disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 57, 338–342.

Gosavi, N., Lee, H.-J., Lee, J.S., Patel, S., and Lee, S.-J. (2002). Golgi fragmentation occurs in the cells with prefibrillar alpha-synuclein aggregates and precedes the formation of fibrillar inclusion. *J. Biol. Chem.* 277, 48984–48992.

Gousset, K., Schiff, E., Langevin, C., Marijanovic, Z., Caputo, A., Browman, D.T., Chenouard, N., de Chaumont, F., Martino, A., Enninga, J., et al. (2009). Prions hijack tunnelling nanotubes for intercellular spread. *Nat. Cell Biol.* 11, 328–336.

Greenbaum, E.A., Graves, C.L., Mishizen-Eberz, A.J., Lupoli, M.A., Lynch, D.R., Englander, S.W., Axelsen, P.H., and Giasson, B.I. (2005). The E46K mutation in alpha-synuclein increases amyloid fibril formation. *J. Biol. Chem.* 280, 7800–7807.

- Hansen, C., Angot, E., Bergström, A.-L., Steiner, J.A., Pieri, L., Paul, G., Outeiro, T.F., Melki, R., Kallunki, P., Fog, K., et al. (2011). α -Synuclein propagates from mouse brain to grafted dopaminergic neurons and seeds aggregation in cultured human cells. *J. Clin. Invest.* 121, 715–725.
- Hara, T., Nakamura, K., Matsui, M., Yamamoto, A., Nakahara, Y., Suzuki-Migishima, R., Yokoyama, M., Mishima, K., Saito, I., Okano, H., et al. (2006). Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature* 441, 885–889.
- Hashimoto, M., Hsu, L.J., Xia, Y., Takeda, A., Sisk, A., Sundsmo, M., and Masliah, E. (1999a). Oxidative stress induces amyloid-like aggregate formation of NACP/alpha-synuclein in vitro. *Neuroreport* 10, 717–721.
- Hashimoto, M., Takeda, A., Hsu, L.J., Takenouchi, T., and Masliah, E. (1999b). Role of cytochrome c as a stimulator of alpha-synuclein aggregation in Lewy body disease. *J. Biol. Chem.* 274, 28849–28852.
- He, H., Dang, Y., Dai, F., Guo, Z., Wu, J., She, X., Pei, Y., Chen, Y., Ling, W., Wu, C., et al. (2003). Post-translational Modifications of Three Members of the Human MAP1LC3 Family and Detection of a Novel Type of Modification for MAP1LC3B. *J. Biol. Chem.* 278, 29278–29287.
- Hebron, M.L., Lonskaya, I., and Moussa, C.E.-H. (2013). Nilotinib reverses loss of dopamine neurons and improves motor behavior via autophagic degradation of α -synuclein in Parkinson's disease models. *Hum. Mol. Genet.* 22, 3315–3328.
- Hernán, M.A., Takkouche, B., Caamaño-Isorna, F., and Gestal-Otero, J.J. (2002). A meta-analysis of coffee drinking, cigarette smoking, and the risk of Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* 52, 276–284.
- Hindle, J.V. (2010). Ageing, neurodegeneration and Parkinson's disease. *Age Ageing* 39, 156–161.
- Hoffman-Zacharska, D., Kozirowski, D., Ross, O.A., Milewski, M., Poznański, J., Jurek, M., Wszolek, Z.K., Soto-Ortolaza, A., Sławek, J., Janik, P., et al. (2013). Novel A18T and pA29S substitutions in α -synuclein may be associated with sporadic Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat. Disord.* 19, 1057–1060.
- Höllerhage, M., Goebel, J.N., de Andrade, A., Hildebrandt, T., Dolga, A., Culmsee, C., Oertel, W.H., Hengerer, B., and Höglinger, G.U. (2014). Trifluoperazine rescues human dopaminergic cells from wild-type α -synuclein-induced toxicity. *Neurobiol. Aging* 35, 1700–1711.
- Holloway, R.G., Shoulson, I., Fahn, S., Kieburtz, K., Lang, A., Marek, K., McDermott, M., Seibyl, J., Weiner, W., Musch, B., et al. (2004). Pramipexole vs levodopa as initial treatment for Parkinson disease: a 4-year randomized controlled trial. *Arch. Neurol.* 61, 1044–1053.
- Hoshimaru, M., Ray, J., Sah, D.W., and Gage, F.H. (1996). Differentiation of the immortalized adult neuronal progenitor cell line HC2S2 into neurons by regulatable suppression of the v-myc oncogene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 1518–1523.

Hoyer, W., Cherny, D., Subramaniam, V., and Jovin, T.M. (2004). Impact of the acidic C-terminal region comprising amino acids 109-140 on alpha-synuclein aggregation in vitro. *Biochemistry (Mosc.)* 43, 16233–16242.

Hsiao, S.C., Liu, H., Holstlaw, T.A., Liu, C., Francis, C.Y., and Francis, M.B. (2013). Real time assays for quantifying cytotoxicity with single cell resolution. *PloS One* 8, e66739.

Hubbi, M.E., Hu, H., Kshitiz, Ahmed, I., Levchenko, A., and Semenza, G.L. (2013). Chaperone-mediated autophagy targets hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) for lysosomal degradation. *J. Biol. Chem.* 288, 10703–10714.

Hughes, A.J., Daniel, S.E., Kilford, L., and Lees, A.J. (1992). Accuracy of clinical diagnosis of idiopathic Parkinson's disease: a clinico-pathological study of 100 cases. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 55, 181–184.

Hughes, A.J., Daniel, S.E., Ben-Shlomo, Y., and Lees, A.J. (2002). The accuracy of diagnosis of parkinsonian syndromes in a specialist movement disorder service. *Brain J. Neurol.* 125, 861–870.

International Parkinson's Disease Genomics Consortium (IPDGC), and Wellcome Trust Case Control Consortium 2 (WTCCC2) (2011). A two-stage meta-analysis identifies several new loci for Parkinson's disease. *PLoS Genet.* 7, e1002142.

Inzelberg, R., Schechtman, E., and Paleacu, D. (2002). Onset age of Parkinson disease. *Am. J. Med. Genet.* 111, 459–460; author reply 461.

Iwai, A., Masliah, E., Yoshimoto, M., Ge, N., Flanagan, L., de Silva, H.A., Kittel, A., and Saitoh, T. (1995). The precursor protein of non-A beta component of Alzheimer's disease amyloid is a presynaptic protein of the central nervous system. *Neuron* 14, 467–475.

Iwamoto, K., Mata, D., Linn, D.M., and Linn, C.L. (2013). Neuroprotection of rat retinal ganglion cells mediated through alpha7 nicotinic acetylcholine receptors. *Neuroscience* 237, 184–198.

Jakes, R., Spillantini, M.G., and Goedert, M. (1994). Identification of two distinct synucleins from human brain. *FEBS Lett.* 345, 27–32.

Jensen, P.H., Hojrup, P., Hager, H., Nielsen, M.S., Jacobsen, L., Olesen, O.F., Gliemann, J., and Jakes, R. (1997). Binding of Abeta to alpha- and beta-synucleins: identification of segments in alpha-synuclein/NAC precursor that bind Abeta and NAC. *Biochem. J.* 323 (Pt 2), 539–546.

Kalaitzakis, M.E., Graeber, M.B., Gentleman, S.M., and Pearce, R.K.B. (2008). Controversies over the staging of α -synuclein pathology in Parkinson's disease. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 116, 125–128.

Karpinar, D.P., Balija, M.B.G., Kügler, S., Opazo, F., Rezaei-Ghaleh, N., Wender, N., Kim, H.-Y., Taschenberger, G., Falkenburger, B.H., Heise, H., et al. (2009). Pre-fibrillar alpha-synuclein variants with impaired beta-structure increase neurotoxicity in Parkinson's disease models. *EMBO J.* 28, 3256–3268.

Katzenschlager, R., Head, J., Schrag, A., Ben-Shlomo, Y., Evans, A., Lees, A.J., and Parkinson's Disease Research Group of the United Kingdom (2008). Fourteen-year final report of the randomized PDRG-UK trial comparing three initial treatments in PD. *Neurology* 71, 474–480.

- Kaushik, S., and Cuervo, A.M. (2008). Chaperone-mediated autophagy. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 445, 227–244.
- Kawai, A., Uchiyama, H., Takano, S., Nakamura, N., and Ohkuma, S. (2007). Autophagosome-lysosome fusion depends on the pH in acidic compartments in CHO cells. *Autophagy* 3, 154–157.
- Kerr, J.F., Wyllie, A.H., and Currie, A.R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* 26, 239–257.
- Kiebertz, K., and Wunderle, K.B. (2013). Parkinson's disease: evidence for environmental risk factors. *Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc.* 28, 8–13.
- Kim, H.-Y., Cho, M.-K., Kumar, A., Maier, E., Siebenhaar, C., Becker, S., Fernandez, C.O., Lashuel, H.A., Benz, R., Lange, A., et al. (2009). Structural properties of pore-forming oligomers of alpha-synuclein. *J. Am. Chem. Soc.* 131, 17482–17489.
- Kingsbury, A.E., Daniel, S.E., Sangha, H., Eisen, S., Lees, A.J., and Foster, O.J.F. (2004). Alteration in alpha-synuclein mRNA expression in Parkinson's disease. *Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc.* 19, 162–170.
- Klionsky, D.J. (2005). The molecular machinery of autophagy: unanswered questions. *J. Cell Sci.* 118, 7–18.
- Klionsky, D.J., Elazar, Z., Seglen, P.O., and Rubinsztein, D.C. (2008). Does bafilomycin A1 block the fusion of autophagosomes with lysosomes? *Autophagy* 4, 849–850.
- Klionsky, D.J., Abdalla, F.C., Abeliovich, H., Abraham, R.T., Acevedo-Arozena, A., Adeli, K., Agholme, L., Agnello, M., Agostinis, P., Aguirre-Ghiso, J.A., et al. (2012). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy* 8, 445–544.
- Klucken, J., Poehler, A.-M., Ebrahimi-Fakhari, D., Schneider, J., Nuber, S., Rockenstein, E., Schlötzer-Schrehardt, U., Hyman, B.T., McLean, P.J., Masliah, E., et al. (2012). Alpha-synuclein aggregation involves a bafilomycin A 1-sensitive autophagy pathway. *Autophagy* 8, 754–766.
- Koch, K., Mansi, K., Haynes, E., Adams, C.E., Sampson, S., and Furtado, V.A. (2014). Trifluoperazine versus placebo for schizophrenia. *Cochrane Database Syst. Rev.* 1, CD010226.
- Komatsu, M., Waguri, S., Chiba, T., Murata, S., Iwata, J., Tanida, I., Ueno, T., Koike, M., Uchiyama, Y., Kominami, E., et al. (2006). Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature* 441, 880–884.
- Koo, H.-J., Choi, M.Y., and Im, H. (2009). Aggregation-defective alpha-synuclein mutants inhibit the fibrillation of Parkinson's disease-linked alpha-synuclein variants. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 386, 165–169.
- Kordower, J.H., Chu, Y., Hauser, R.A., Freeman, T.B., and Olanow, C.W. (2008). Lewy body-like pathology in long-term embryonic nigral transplants in Parkinson's disease. *Nat. Med.* 14, 504–506.
- Korzeniewski, C., and Callewaert, D.M. (1983). An enzyme-release assay for natural cytotoxicity. *J. Immunol. Methods* 64, 313–320.

- Kosaka, K. (1978). Lewy bodies in cerebral cortex, report of three cases. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 42, 127–134.
- Kostka, M., Högen, T., Danzer, K.M., Levin, J., Habeck, M., Wirth, A., Wagner, R., Glabe, C.G., Finger, S., Heinzelmann, U., et al. (2008). Single particle characterization of iron-induced pore-forming alpha-synuclein oligomers. *J. Biol. Chem.* 283, 10992–11003.
- Kroemer, G., Galluzzi, L., Vandenabeele, P., Abrams, J., Alnemri, E.S., Baehrecke, E.H., Blagosklonny, M.V., El-Deiry, W.S., Golstein, P., Green, D.R., et al. (2009). Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ.* 16, 3–11.
- Krüger, R., Kuhn, W., Müller, T., Woitalla, D., Graeber, M., Kösel, S., Przuntek, H., Epplen, J.T., Schöls, L., and Riess, O. (1998). Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease. *Nat. Genet.* 18, 106–108.
- Kunz, J.B., Schwarz, H., and Mayer, A. (2004). Determination of four sequential stages during microautophagy in vitro. *J. Biol. Chem.* 279, 9987–9996.
- Langston, J.W., Ballard, P., Tetrud, J.W., and Irwin, I. (1983). Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science* 219, 979–980.
- Langston, J.W., Forno, L.S., Tetrud, J., Reeves, A.G., Kaplan, J.A., and Karluk, D. (1999). Evidence of active nerve cell degeneration in the substantia nigra of humans years after 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine exposure. *Ann. Neurol.* 46, 598–605.
- Larsen, K.E., Schmitz, Y., Troyer, M.D., Mosharov, E., Dietrich, P., Quazi, A.Z., Savalle, M., Nemani, V., Chaudhry, F.A., Edwards, R.H., et al. (2006). Alpha-synuclein overexpression in PC12 and chromaffin cells impairs catecholamine release by interfering with a late step in exocytosis. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 26, 11915–11922.
- Lee, C.M., and Tannock, I.F. (2006). Inhibition of endosomal sequestration of basic anticancer drugs: influence on cytotoxicity and tissue penetration. *Br. J. Cancer* 94, 863–869.
- Lee, H.-J., Khoshaghideh, F., Patel, S., and Lee, S.-J. (2004). Clearance of alpha-synuclein oligomeric intermediates via the lysosomal degradation pathway. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 24, 1888–1896.
- Lee, H.-J., Suk, J.-E., Bae, E.-J., Lee, J.-H., Paik, S.R., and Lee, S.-J. (2008). Assembly-dependent endocytosis and clearance of extracellular alpha-synuclein. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 40, 1835–1849.
- Lees, A.J., Hardy, J., and Revesz, T. (2009). Parkinson's disease. *Lancet* 373, 2055–2066.
- Lesage, S., Anheim, M., Letournel, F., Bousset, L., Honoré, A., Rozas, N., Pieri, L., Madiona, K., Dürr, A., Melki, R., et al. (2013). G51D α -synuclein mutation causes a novel parkinsonian-pyramidal syndrome. *Ann. Neurol.*
- Lewy, F. (1913). Zur pathologischen Anatomie der Paralysis agitans. *Dt Z Nervheil* 50–5.

- Li, J., Uversky, V.N., and Fink, A.L. (2001). Effect of familial Parkinson's disease point mutations A30P and A53T on the structural properties, aggregation, and fibrillation of human alpha-synuclein. *Biochemistry (Mosc.)* 40, 11604–11613.
- Li, J.-Y., Englund, E., Holton, J.L., Soulet, D., Hagell, P., Lees, A.J., Lashley, T., Quinn, N.P., Rehnkrone, S., Björklund, A., et al. (2008). Lewy bodies in grafted neurons in subjects with Parkinson's disease suggest host-to-graft disease propagation. *Nat. Med.* 14, 501–503.
- Li, L., Wang, X., Fei, X., Xia, L., Qin, Z., and Liang, Z. (2011). Parkinson's disease involves autophagy and abnormal distribution of cathepsin L. *Neurosci. Lett.* 489, 62–67.
- Lilienbaum, A. (2013). Relationship between the proteasomal system and autophagy. *Int. J. Biochem. Mol. Biol.* 4, 1–26.
- Lill, C.M., Roehr, J.T., McQueen, M.B., Kavvoura, F.K., Bagade, S., Schjeide, B.-M.M., Schjeide, L.M., Meissner, E., Zauft, U., Allen, N.C., et al. (2012). Comprehensive research synopsis and systematic meta-analyses in Parkinson's disease genetics: The PDGene database. *PLoS Genet.* 8, e1002548.
- Lotharius, J., Barg, S., Wiekop, P., Lundberg, C., Raymon, H.K., and Brundin, P. (2002). Effect of mutant alpha-synuclein on dopamine homeostasis in a new human mesencephalic cell line. *J. Biol. Chem.* 277, 38884–38894.
- Lotharius, J., Falsig, J., van Beek, J., Payne, S., Dringen, R., Brundin, P., and Leist, M. (2005). Progressive degeneration of human mesencephalic neuron-derived cells triggered by dopamine-dependent oxidative stress is dependent on the mixed-lineage kinase pathway. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 25, 6329–6342.
- Löw, K., and Aebischer, P. (2012). Use of viral vectors to create animal models for Parkinson's disease. *Neurobiol. Dis.* 48, 189–201.
- Luk, K.C., Kehm, V., Carroll, J., Zhang, B., O'Brien, P., Trojanowski, J.Q., and Lee, V.M.-Y. (2012). Pathological α -synuclein transmission initiates Parkinson-like neurodegeneration in nontransgenic mice. *Science* 338, 949–953.
- Lynch-Day, M.A., Mao, K., Wang, K., Zhao, M., and Klionsky, D.J. (2012). The role of autophagy in Parkinson's disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2, a009357.
- Manolio, T.A., Collins, F.S., Cox, N.J., Goldstein, D.B., Hindorff, L.A., Hunter, D.J., McCarthy, M.I., Ramos, E.M., Cardon, L.R., Chakravarti, A., et al. (2009). Finding the missing heritability of complex diseases. *Nature* 461, 747–753.
- Marques, L.O., Lima, M.S., and Soares, B.G.O. (2004). Trifluoperazine for schizophrenia. *Cochrane Database Syst. Rev.* CD003545.
- Masliah, E., Rockenstein, E., Veinbergs, I., Mallory, M., Hashimoto, M., Takeda, A., Sagara, Y., Sisk, A., and Mucke, L. (2000). Dopaminergic loss and inclusion body formation in alpha-synuclein mice: implications for neurodegenerative disorders. *Science* 287, 1265–1269.
- Masuda-Suzukake, M., Nonaka, T., Hosokawa, M., Oikawa, T., Arai, T., Akiyama, H., Mann, D.M.A., and Hasegawa, M. (2013). Prion-like spreading of pathological α -synuclein in brain. *Brain J. Neurol.* 136, 1128–1138.

- McDonald, W.M., Richard, I.H., and DeLong, M.R. (2003). Prevalence, etiology, and treatment of depression in Parkinson's disease. *Biol. Psychiatry* 54, 363–375.
- McGeer, P.L., McGeer, E.G., and Suzuki, J.S. (1977). Aging and extrapyramidal function. *Arch. Neurol.* 34, 33–35.
- McNaught, K.S.P., Belizaire, R., Isacson, O., Jenner, P., and Olanow, C.W. (2003). Altered proteasomal function in sporadic Parkinson's disease. *Exp. Neurol.* 179, 38–46.
- Meuvis, J., Gerard, M., Desender, L., Baekelandt, V., and Engelborghs, Y. (2010). The conformation and the aggregation kinetics of α -synuclein depend on the proline residues in its C-terminal region. *Biochemistry (Mosc.)* 49, 9345–9352.
- Migliore, L., and Coppedè, F. (2009). Environmental-induced oxidative stress in neurodegenerative disorders and aging. *Mutat. Res.* 674, 73–84.
- Miller, D.W., Hague, S.M., Clarimon, J., Baptista, M., Gwinn-Hardy, K., Cookson, M.R., and Singleton, A.B. (2004). Alpha-synuclein in blood and brain from familial Parkinson disease with SNCA locus triplication. *Neurology* 62, 1835–1838.
- Murphy, D.D., Rueter, S.M., Trojanowski, J.Q., and Lee, V.M. (2000). Synucleins are developmentally expressed, and alpha-synuclein regulates the size of the presynaptic vesicular pool in primary hippocampal neurons. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 20, 3214–3220.
- Narendra, D., Tanaka, A., Suen, D.-F., and Youle, R.J. (2008). Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy. *J. Cell Biol.* 183, 795–803.
- Narendra, D.P., Jin, S.M., Tanaka, A., Suen, D.-F., Gautier, C.A., Shen, J., Cookson, M.R., and Youle, R.J. (2010). PINK1 is selectively stabilized on impaired mitochondria to activate Parkin. *PLoS Biol.* 8, e1000298.
- Oertel, W.H., Wolters, E., Sampaio, C., Gimenez-Roldan, S., Bergamasco, B., Dujardin, M., Grosset, D.G., Arnold, G., Leenders, K.L., Hundemer, H.-P., et al. (2006). Pergolide versus levodopa monotherapy in early Parkinson's disease patients: The PELMOPET study. *Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc.* 21, 343–353.
- Oertel, W.H., Depboylu, C., Krenzer, M., Vadasz, D., Ries, V., Sixel-Döring, F., and Mayer, G. (2014). [REM sleep behavior disorder as a prodromal stage of α -synucleinopathies: symptoms, epidemiology, pathophysiology, diagnosis and therapy]. *Nervenarzt* 85, 19–25.
- Okun, M.S., Gallo, B.V., Mandybur, G., Jagid, J., Foote, K.D., Revilla, F.J., Alterman, R., Jankovic, J., Simpson, R., Junn, F., et al. (2012). Subthalamic deep brain stimulation with a constant-current device in Parkinson's disease: an open-label randomised controlled trial. *Lancet Neurol.* 11, 140–149.
- Olanow, C.W., and Prusiner, S.B. (2009). Is Parkinson's disease a prion disorder? *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 12571–12572.
- Owen, A.D., Schapira, A.H., Jenner, P., and Marsden, C.D. (1996). Oxidative stress and Parkinson's disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 786, 217–223.

Palacios, N., Gao, X., McCullough, M.L., Schwarzschild, M.A., Shah, R., Gapstur, S., and Ascherio, A. (2012). Caffeine and risk of Parkinson's disease in a large cohort of men and women. *Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc.* 27, 1276–1282.

Palma, J.-A., and Kaufmann, H. (2014). Autonomic disorders predicting Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat. Disord.* 20 Suppl 1, S94-98.

Papadimitriou, D., Antonelou, R., Miligkos, M., Maniati, M., Papagiannakis, N., Bostantjopoulou, S., Leonardos, A., Koros, C., Simitsi, A., Papageorgiou, S.G., et al. (2016). Motor and Nonmotor Features of Carriers of the p.A53T Alpha-Synuclein Mutation: A Longitudinal Study: Alpha-Synuclein Mutation Cohort. *Mov. Disord.* 31, 1226–1230.

Park, H.J., Shin, J.Y., Kim, H.N., Oh, S.H., and Lee, P.H. (2014). Neuroprotective effects of mesenchymal stem cells through autophagy modulation in a parkinsonian model. *Neurobiol. Aging* 35, 1920–1928.

Parkinson, J. (1817). *An essay on the shaking palsy*. Lond. Sherwood Neely Jones.

Parkkinen, L., Pirttilä, T., and Alafuzoff, I. (2008). Applicability of current staging/categorization of alpha-synuclein pathology and their clinical relevance. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 115, 399–407.

Pasanen, P., Myllykangas, L., Siitonen, M., Raunio, A., Kaakkola, S., Lyytinen, J., Tienari, P.J., Pöyhönen, M., and Paetau, A. (2014). A novel α -synuclein mutation A53E associated with atypical multiple system atrophy and Parkinson's disease-type pathology. *Neurobiol. Aging* 35, 2180.e1-2180.e5.

Paxinou, E., Chen, Q., Weisse, M., Giasson, B.I., Norris, E.H., Rueter, S.M., Trojanowski, J.Q., Lee, V.M., and Ischiropoulos, H. (2001). Induction of alpha-synuclein aggregation by intracellular nitrative insult. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 21, 8053–8061.

Peng, X., Peng, X.M., Tehranian, R., Dietrich, P., Stefanis, L., and Perez, R.G. (2005). Alpha-synuclein activation of protein phosphatase 2A reduces tyrosine hydroxylase phosphorylation in dopaminergic cells. *J. Cell Sci.* 118, 3523–3530.

Pennington, S., Snell, K., Lee, M., and Walker, R. (2010). The cause of death in idiopathic Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat. Disord.* 16, 434–437.

Perez, R.G., Waymire, J.C., Lin, E., Liu, J.J., Guo, F., and Zigmond, M.J. (2002). A role for alpha-synuclein in the regulation of dopamine biosynthesis. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 22, 3090–3099.

Periquet, M., Fulga, T., Myllykangas, L., Schlossmacher, M.G., and Feany, M.B. (2007). Aggregated alpha-synuclein mediates dopaminergic neurotoxicity in vivo. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 27, 3338–3346.

Polymeropoulos, M.H., Lavedan, C., Leroy, E., Ide, S.E., Dehejia, A., Dutra, A., Pike, B., Root, H., Rubenstein, J., Boyer, R., et al. (1997). Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* 276, 2045–2047.

Poole, B., and Ohkuma, S. (1981). Effect of weak bases on the intralysosomal pH in mouse peritoneal macrophages. *J. Cell Biol.* 90, 665–669.

- Poulopoulos, M., Levy, O.A., and Alcalay, R.N. (2012). The neuropathology of genetic Parkinson's disease. *Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc.* 27, 831–842.
- Quilty, M.C., King, A.E., Gai, W.-P., Pountney, D.L., West, A.K., Vickers, J.C., and Dickson, T.C. (2006). Alpha-synuclein is upregulated in neurones in response to chronic oxidative stress and is associated with neuroprotection. *Exp. Neurol.* 199, 249–256.
- Rascol, O., Brooks, D.J., Korczyn, A.D., De Deyn, P.P., Clarke, C.E., and Lang, A.E. (2000). A five-year study of the incidence of dyskinesia in patients with early Parkinson's disease who were treated with ropinirole or levodopa. 056 Study Group. *N. Engl. J. Med.* 342, 1484–1491.
- Ravikumar, B., Duden, R., and Rubinsztein, D.C. (2002). Aggregate-prone proteins with polyglutamine and polyalanine expansions are degraded by autophagy. *Hum. Mol. Genet.* 11, 1107–1117.
- Reardon, G.T., Rifkin, A., Schwartz, A., Myerson, A., and Siris, S.G. (1989). Changing patterns of neuroleptic dosage over a decade. *Am. J. Psychiatry* 146, 726–729.
- Recasens, A., and Dehay, B. (2014). Alpha-synuclein spreading in Parkinson's disease. *Front. Neuroanat.* 8, 159.
- Reynolds, N.P., Soragni, A., Rabe, M., Verdes, D., Liverani, E., Handschin, S., Riek, R., and Seeger, S. (2011). Mechanism of membrane interaction and disruption by α -synuclein. *J. Am. Chem. Soc.* 133, 19366–19375.
- Rideout, H.J., Larsen, K.E., Sulzer, D., and Stefanis, L. (2001). Proteasomal inhibition leads to formation of ubiquitin/alpha-synuclein-immunoreactive inclusions in PC12 cells. *J. Neurochem.* 78, 899–908.
- Rospigliosi, C.C., McClendon, S., Schmid, A.W., Ramlall, T.F., Barré, P., Lashuel, H.A., and Eliezer, D. (2009). E46K Parkinson's-linked mutation enhances C-terminal-to-N-terminal contacts in alpha-synuclein. *J. Mol. Biol.* 388, 1022–1032.
- Rubinsztein, D.C., Cuervo, A.M., Ravikumar, B., Sarkar, S., Korolchuk, V., Kaushik, S., and Klionsky, D.J. (2009). In search of an "autophagometer." *Autophagy* 5, 585–589.
- Samii, A., Nutt, J.G., and Ransom, B.R. (2004). Parkinson's disease. *Lancet* 363, 1783–1793.
- Schapira, A.H. (1995). Oxidative stress in Parkinson's disease. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 21, 3–9.
- Schapira, A.H., Cooper, J.M., Dexter, D., Jenner, P., Clark, J.B., and Marsden, C.D. (1989). Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *Lancet* 1, 1269.
- Schapira, A.H., Cooper, J.M., Dexter, D., Clark, J.B., Jenner, P., and Marsden, C.D. (1990). Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *J. Neurochem.* 54, 823–827.
- Schenck, C.H., Boeve, B.F., and Mahowald, M.W. (2013). Delayed emergence of a parkinsonian disorder or dementia in 81% of older men initially diagnosed with idiopathic rapid eye movement sleep behavior disorder: a 16-year update on a previously reported series. *Sleep Med.* 14, 744–748.

Schuepbach, W.M.M., Rau, J., Knudsen, K., Volkmann, J., Krack, P., Timmermann, L., Hälbig, T.D., Hesekamp, H., Navarro, S.M., Meier, N., et al. (2013). Neurostimulation for Parkinson's disease with early motor complications. *N. Engl. J. Med.* 368, 610–622.

Schulz-Schaeffer, W.J. (2010). The synaptic pathology of alpha-synuclein aggregation in dementia with Lewy bodies, Parkinson's disease and Parkinson's disease dementia. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 120, 131–143.

Seppi, K., Weintraub, D., Coelho, M., Perez-Lloret, S., Fox, S.H., Katzenschlager, R., Hametner, E.-M., Poewe, W., Rascol, O., Goetz, C.G., et al. (2011). The Movement Disorder Society Evidence-Based Medicine Review Update: Treatments for the non-motor symptoms of Parkinson's disease. *Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc.* 26 Suppl 3, S42-80.

Sharon, R., Goldberg, M.S., Bar-Josef, I., Betensky, R.A., Shen, J., and Selkoe, D.J. (2001). alpha-Synuclein occurs in lipid-rich high molecular weight complexes, binds fatty acids, and shows homology to the fatty acid-binding proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 9110–9115.

Sharon, R., Bar-Joseph, I., Frosch, M.P., Walsh, D.M., Hamilton, J.A., and Selkoe, D.J. (2003). The formation of highly soluble oligomers of alpha-synuclein is regulated by fatty acids and enhanced in Parkinson's disease. *Neuron* 37, 583–595.

Shintani, T., and Klionsky, D.J. (2004). Autophagy in health and disease: a double-edged sword. *Science* 306, 990–995.

Shoffner, J.M., Watts, R.L., Juncos, J.L., Torroni, A., and Wallace, D.C. (1991). Mitochondrial oxidative phosphorylation defects in Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* 30, 332–339.

Shulman, J.M., De Jager, P.L., and Feany, M.B. (2011). Parkinson's Disease: Genetics and Pathogenesis. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 6, 193–222.

Simón-Sánchez, J., Schulte, C., Bras, J.M., Sharma, M., Gibbs, J.R., Berg, D., Paisan-Ruiz, C., Lichtner, P., Scholz, S.W., Hernandez, D.G., et al. (2009). Genome-wide association study reveals genetic risk underlying Parkinson's disease. *Nat. Genet.* 41, 1308–1312.

Singer, T.P., and Ramsay, R.R. (1990). Mechanism of the neurotoxicity of MPTP. An update. *FEBS Lett.* 274, 1–8.

Singleton, A.B., Farrer, M., Johnson, J., Singleton, A., Hague, S., Kachergus, J., Hulihan, M., Peuralinna, T., Dutra, A., Nussbaum, R., et al. (2003). alpha-Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. *Science* 302, 841.

Spencer, B., Potkar, R., Trejo, M., Rockenstein, E., Patrick, C., Gindi, R., Adame, A., Wyss-Coray, T., and Masliah, E. (2009). Beclin 1 gene transfer activates autophagy and ameliorates the neurodegenerative pathology in alpha-synuclein models of Parkinson's and Lewy body diseases. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 29, 13578–13588.

Spillantini, M.G., Divane, A., and Goedert, M. (1995). Assignment of human alpha-synuclein (SNCA) and beta-synuclein (SNCB) genes to chromosomes 4q21 and 5q35. *Genomics* 27, 379–381.

Spillantini, M.G., Schmidt, M.L., Lee, V.M., Trojanowski, J.Q., Jakes, R., and Goedert, M. (1997). Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature* 388, 839–840.

Steece-Collier, K., Maries, E., and Kordower, J.H. (2002). Etiology of Parkinson's disease: Genetics and environment revisited. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 13972–13974.

Steele, J.W., Ju, S., Lachenmayer, M.L., Liken, J., Stock, A., Kim, S.H., Delgado, L.M., Alfaro, I.E., Bernales, S., Verdile, G., et al. (2013). Latrepirdine stimulates autophagy and reduces accumulation of α -synuclein in cells and in mouse brain. *Mol. Psychiatry* 18, 882–888.

Stefanis, L., Larsen, K.E., Rideout, H.J., Sulzer, D., and Greene, L.A. (2001). Expression of A53T mutant but not wild-type alpha-synuclein in PC12 cells induces alterations of the ubiquitin-dependent degradation system, loss of dopamine release, and autophagic cell death. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 21, 9549–9560.

Stocchi, F., and Torti, M. (2016). Adjuvant therapies for Parkinson's disease: critical evaluation of safinamide. *Drug Des. Devel. Ther.* 609.

Sulzer, D. (2007). Multiple hit hypotheses for dopamine neuron loss in Parkinson's disease. *Trends Neurosci.* 30, 244–250.

Tai, H.-C., and Schuman, E.M. (2008). Ubiquitin, the proteasome and protein degradation in neuronal function and dysfunction. *Nat. Rev. Neurosci.* 9, 826–838.

Tanaka, M., Kim, Y.M., Lee, G., Junn, E., Iwatsubo, T., and Mouradian, M.M. (2004). Aggresomes formed by alpha-synuclein and synphilin-1 are cytoprotective. *J. Biol. Chem.* 279, 4625–4631.

Tanious, F.A., Veal, J.M., Buczak, H., Ratmeyer, L.S., and Wilson, W.D. (1992). DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) binds differently to DNA and RNA: minor-groove binding at AT sites and intercalation at AU sites. *Biochemistry (Mosc.)* 31, 3103–3112.

Tanner, C.M., Kamel, F., Ross, G.W., Hoppin, J.A., Goldman, S.M., Korell, M., Marras, C., Bhudhikanok, G.S., Kasten, M., Chade, A.R., et al. (2011). Rotenone, paraquat, and Parkinson's disease. *Environ. Health Perspect.* 119, 866–872.

Taschenberger, G., Garrido, M., Tereshchenko, Y., Bähr, M., Zweckstetter, M., and Kügler, S. (2012). Aggregation of α Synuclein promotes progressive in vivo neurotoxicity in adult rat dopaminergic neurons. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 123, 671–683.

Tehrani, R., Montoya, S.E., Van Laar, A.D., Hastings, T.G., and Perez, R.G. (2006). Alpha-synuclein inhibits aromatic amino acid decarboxylase activity in dopaminergic cells. *J. Neurochem.* 99, 1188–1196.

Thacker, E.L., Chen, H., Patel, A.V., McCullough, M.L., Calle, E.E., Thun, M.J., Schwarzschild, M.A., and Ascherio, A. (2008). Recreational physical activity and risk of Parkinson's disease. *Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc.* 23, 69–74.

Tofaris, G.K., Layfield, R., and Spillantini, M.G. (2001). alpha-synuclein metabolism and aggregation is linked to ubiquitin-independent degradation by the proteasome. *FEBS Lett.* 509, 22–26.

Tompkins, M.M., and Hill, W.D. (1997). Contribution of somal Lewy bodies to neuronal death. *Brain Res.* 775, 24–29.

Trenkwalder, C., Kies, B., Rudzinska, M., Fine, J., Nikl, J., Honczarenko, K., Dioszeghy, P., Hill, D., Anderson, T., Myllyla, V., et al. (2011). Rotigotine effects on early morning motor function and sleep in Parkinson's disease: a double-blind, randomized, placebo-controlled study (RECOVER). *Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc.* 26, 90–99.

Trojanowski, J.Q., and Lee, V.M.-Y. (2003). Parkinson's disease and related alpha-synucleinopathies are brain amyloidoses. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 991, 107–110.

Tsvetkov, A.S., Miller, J., Arrasate, M., Wong, J.S., Pleiss, M.A., and Finkbeiner, S. (2010). A small-molecule scaffold induces autophagy in primary neurons and protects against toxicity in a Huntington disease model. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 16982–16987.

Twelves, D., Perkins, K.S.M., and Counsell, C. (2003). Systematic review of incidence studies of Parkinson's disease. *Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc.* 18, 19–31.

Ueda, K., Fukushima, H., Masliah, E., Xia, Y., Iwai, A., Yoshimoto, M., Otero, D.A., Kondo, J., Ihara, Y., and Saitoh, T. (1993). Molecular cloning of cDNA encoding an unrecognized component of amyloid in Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 11282–11286.

Uversky, V.N. (2007). Neuropathology, biochemistry, and biophysics of alpha-synuclein aggregation. *J. Neurochem.* 103, 17–37.

Uversky, V.N. (2011). Intrinsically disordered proteins from A to Z. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 43, 1090–1103.

van Rooijen, B.D., Claessens, M.M.A.E., and Subramaniam, V. (2010). Membrane Permeabilization by Oligomeric α -Synuclein: In Search of the Mechanism. *PLoS One* 5, e14292.

Venda, L.L., Cragg, S.J., Buchman, V.L., and Wade-Martins, R. (2010). α -Synuclein and dopamine at the crossroads of Parkinson's disease. *Trends Neurosci.* 33, 559–568.

Villar-Piqué, A., Lopes da Fonseca, T., Sant'Anna, R., Szegö, É.M., Fonseca-Ornelas, L., Pinho, R., Carija, A., Gerhardt, E., Masaracchia, C., Abad Gonzalez, E., et al. (2016). Environmental and genetic factors support the dissociation between α -synuclein aggregation and toxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 113, E6506–E6515.

Vlad, C., Lindner, K., Karreman, C., Schildknecht, S., Leist, M., Tomczyk, N., Rontree, J., Langridge, J., Danzer, K., Ciossek, T., et al. (2011). Autoproteolytic fragments are intermediates in the oligomerization/aggregation of the Parkinson's disease protein alpha-synuclein as revealed by ion mobility mass spectrometry. *Chembiochem Eur. J. Chem. Biol.* 12, 2740–2744.

Vogiatzi, T., Xilouri, M., Vekrellis, K., and Stefanis, L. (2008). Wild type alpha-synuclein is degraded by chaperone-mediated autophagy and macroautophagy in neuronal cells. *J. Biol. Chem.* 283, 23542–23556.

Volpicelli-Daley, L.A., Luk, K.C., Patel, T.P., Tanik, S.A., Riddle, D.M., Stieber, A., Meaney, D.F., Trojanowski, J.Q., and Lee, V.M.-Y. (2011). Exogenous α -synuclein fibrils induce Lewy body pathology leading to synaptic dysfunction and neuron death. *Neuron* 72, 57–71.

Wakabayashi, K., Tanji, K., Mori, F., and Takahashi, H. (2007). The Lewy body in Parkinson's disease: molecules implicated in the formation and degradation of alpha-synuclein aggregates. *Neuropathol. Off. J. Jpn. Soc. Neuropathol.* 27, 494–506.

- Walsh, D.M., and Selkoe, D.J. (2004). Oligomers on the brain: the emerging role of soluble protein aggregates in neurodegeneration. *Protein Pept. Lett.* *11*, 213–228.
- Wang, W., Perovic, I., Chittuluru, J., Kaganovich, A., Nguyen, L.T.T., Liao, J., Auclair, J.R., Johnson, D., Landru, A., Simorellis, A.K., et al. (2011). A soluble α -synuclein construct forms a dynamic tetramer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 17797–17802.
- Webb, J.L., Ravikumar, B., Atkins, J., Skepper, J.N., and Rubinsztein, D.C. (2003). Alpha-Synuclein is degraded by both autophagy and the proteasome. *J. Biol. Chem.* *278*, 25009–25013.
- White, N.J., Pukrittayakamee, S., Hien, T.T., Faiz, M.A., Mokuolu, O.A., and Dondorp, A.M. (2014). Malaria. *Lancet* *383*, 723–735.
- Whitworth, A.J. (2011). Drosophila models of Parkinson's disease. *Adv. Genet.* *73*, 1–50.
- Winklhofer, K.F., Tatzelt, J., and Haass, C. (2008). The two faces of protein misfolding: gain- and loss-of-function in neurodegenerative diseases. *EMBO J.* *27*, 336–349.
- Winner, B., Jappelli, R., Maji, S.K., Desplats, P.A., Boyer, L., Aigner, S., Hetzer, C., Loher, T., Vilar, M., Campioni, S., et al. (2011a). In vivo demonstration that alpha-synuclein oligomers are toxic. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 4194–4199.
- Winner, B., Jappelli, R., Maji, S.K., Desplats, P.A., Boyer, L., Aigner, S., Hetzer, C., Loher, T., Vilar, M., Campioni, S., et al. (2011b). In vivo demonstration that alpha-synuclein oligomers are toxic. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 4194–4199.
- Winslow, A.R., and Rubinsztein, D.C. (2011). The Parkinson disease protein α -synuclein inhibits autophagy. *Autophagy* *7*, 429–431.
- Winslow, A.R., Chen, C.-W., Corrochano, S., Acevedo-Arozena, A., Gordon, D.E., Peden, A.A., Lichtenberg, M., Menzies, F.M., Ravikumar, B., Imarisio, S., et al. (2010). α -Synuclein impairs macroautophagy: implications for Parkinson's disease. *J. Cell Biol.* *190*, 1023–1037.
- Worth, P.F. (2013). How to treat Parkinson's disease in 2013. *Clin. Med. Lond. Engl.* *13*, 93–96.
- Xilouri, M., Vogiatzi, T., Vekrellis, K., Park, D., and Stefanis, L. (2009). Abberant alpha-synuclein confers toxicity to neurons in part through inhibition of chaperone-mediated autophagy. *PLoS One* *4*, e5515.
- Xiong, N., Xiong, J., Jia, M., Liu, L., Zhang, X., Chen, Z., Huang, J., Zhang, Z., Hou, L., Luo, Z., et al. (2013). The role of autophagy in Parkinson's disease: rotenone-based modeling. *Behav. Brain Funct.* *BBF* *9*, 13.
- Yavich, L., Oksman, M., Tanila, H., Kerokoski, P., Hiltunen, M., van Groen, T., Puoliväli, J., Männistö, P.T., García-Horsman, A., MacDonald, E., et al. (2005). Locomotor activity and evoked dopamine release are reduced in mice overexpressing A30P-mutated human alpha-synuclein. *Neurobiol. Dis.* *20*, 303–313.
- Yoshino, H., Hirano, M., Stoessl, A.J., Imamichi, Y., Ikeda, A., Li, Y., Funayama, M., Yamada, I., Nakamura, Y., Sossi, V., et al. (2017). Homozygous alpha-synuclein p.A53V in familial Parkinson's disease. *Neurobiol. Aging* *57*, 248.e7-248.e12.

Yu, W.H., Dorado, B., Figueroa, H.Y., Wang, L., Planel, E., Cookson, M.R., Clark, L.N., and Duff, K.E. (2009). Metabolic activity determines efficacy of macroautophagic clearance of pathological oligomeric alpha-synuclein. *Am. J. Pathol.* 175, 736–747.

Zaccai, J., Brayne, C., McKeith, I., Matthews, F., Ince, P.G., and MRC Cognitive Function, Ageing Neuropathology Study (2008). Patterns and stages of alpha-synucleinopathy: Relevance in a population-based cohort. *Neurology* 70, 1042–1048.

Zarranz, J.J., Alegre, J., Gómez-Esteban, J.C., Lezcano, E., Ros, R., Ampuero, I., Vidal, L., Hoenicka, J., Rodriguez, O., Atarés, B., et al. (2004). The new mutation, E46K, of alpha-synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia. *Ann. Neurol.* 55, 164–173.

Zhang, L., Yu, J., Pan, H., Hu, P., Hao, Y., Cai, W., Zhu, H., Yu, A.D., Xie, X., Ma, D., et al. (2007). Small molecule regulators of autophagy identified by an image-based high-throughput screen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 19023–19028.

Zhang, N.-Y., Tang, Z., and Liu, C.-W. (2008). alpha-Synuclein protofibrils inhibit 26 S proteasome-mediated protein degradation: understanding the cytotoxicity of protein protofibrils in neurodegenerative disease pathogenesis. *J. Biol. Chem.* 283, 20288–20298.

Zhou, W., Hurlbert, M.S., Schaack, J., Prasad, K.N., and Freed, C.R. (2000). Overexpression of human alpha-synuclein causes dopamine neuron death in rat primary culture and immortalized mesencephalon-derived cells. *Brain Res.* 866, 33–43.

7 Anhang

7.1 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrerinnen und Lehrer, denen ich an dieser Stelle herzlich danken möchte, waren in alphabetischer Reihenfolge

an der Philipps-Universität Marburg die Damen und Herren:

Adamkiewicz, Alter, Barth, Bartsch, Basler, Bauer, Baum, Baumann, Becker, Bette, Bien, Brehm, Burchert, Cetin, Culmsee, Czubayko, Daut, del Rey, Depboylu, Dietrich, Dodel, Donner-Banzhoff, Eberhart, Eggert, Eickmann, Ellenrieder, Engenhardt-Cabillic, Feuser, Fuchs-Winkelmann, Geks, Görg C, Görg K, Gress, Grimm, Grosse, Grundmann, Grzeschik, Hamer, Hertl, Höffken, Hofmann, Höglinger, Hoyer, Jacob, Kann, Kill, Kircher, Klenk, Klose, Knake, Köhler, König, Koolman, Krieg, Kühnert, Leonhardt, Lill, Lingenfelder, Löffler, Lohoff, Lüers, Maier R, Maier T, Maisch, Maisner, Mahnken, Meißner, Michl, Moll, Moosdorf, Mueller, Müller, Müller-Brüsselbach, Mutters, Neubauer, Nimsky, Oertel, Oliver, Opitz, Pagenstecher, Pankuweit, Plant, Portig, Ramaswamy, Renz, Richter, Ries, Röhm, Rosenow, Ruchholtz, Schäfer H, Schäfer J, Schäfer M, Schepelmann, Schieffer, Schmidt, Schofer, Schütz, Schulze, Seitz, Sekundo, Sevinc, Shams-Eldin, Sommer, Steiniger, Steinkamp, Stiewe, Strik, Suske, Tackenberg, Teepker, Teymoortash, Vogelmeier, Vogt, Voigt, Wagner, Weihe, Welter, Werner, Westermann, Wulf

am Cambridge University Hospital (Addenbrooke's Hospital) die Damen und Herren:

Berman, Dixon, Lomas, Sala, Winterbottom

am Kantonsspital St. Gallen die Damen und Herren:

Felbecker, Hägele-Link, Kägi, Tettenborn, Vehoff

7.2 Danksagung

Danken möchte ich

meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Günter U. Höglinger (Inhaber des Lehrstuhls für Translationale Neurodegeneration am Deutschen Zentrum für Neurodegenerative

Erkrankungen am Standort München) für die Überlassung des Themas und damit die Möglichkeit zur Durchführung dieser Doktorarbeit,

meinem Betreuer Herrn Dr. med. Matthias Höllerhage für die exzellente Betreuung dieser Arbeit und das weit über das übliche Maß hinausgehende Engagement,

Dr. Matthias Höllerhage, Dr. Anderson C.F. de Andrade, Dr. Tobias Hildebrandt, PD Dr. Amalia Dolga, Prof. Dr. Carsten Culmsee, Prof. Dr. Dr. h.c. Wolfgang H. Oertel, Prof. Dr. Bastian Hengerer und Prof. Dr. Günter U. Höglinger für die Hilfe bei der Erstellung des Manuskripts zur wissenschaftlichen Veröffentlichung dieser Arbeit als Originalartikel,

der gesamten Arbeitsgruppe für experimentelle Neurologie für die gute Zusammenarbeit, anregende Diskussionen und ein motivierendes Arbeitsumfeld,

Herrn Dr. med. Matthias Höllerhage für das Korrekturlesen dieser Arbeit,

meinen Eltern und meiner Lebensgefährtin Diana Rohrbeck für fortwährende persönliche Unterstützung.